

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

Fábio Cristiano Angonesi Brod

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DE LIPASE RECOMBINANTE DE *Staphylococcus*  
*xylosus* E ESTERASE RECOMBINANTE DE *Lactobacillus*  
*plantarum***

Florianópolis

2010



Fábio Cristiano Angonesi Brod

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA DE LIPASE RECOMBINANTE DE *Staphylococcus  
xylosus* E ESTERASE RECOMBINANTE DE *Lactobacillus  
plantarum***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi.

Florianópolis

2010

Catlogação na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B864e Brod, Fábio Cristiano Angonesi

Expressão, purificação e caracterização bioquímica de  
lípase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e esterase  
recombinante de *Lactobacillus plantarum* [tese] / Fábio  
Cristiano Angonesi Brod ; orientadora, Ana Carolina  
Maisonave Arisi. - Florianópolis, SC, 2010.

111 p.: il., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Tecnologia de alimentos. 2. Ciência dos alimentos.  
3. Lipase. 4. *Staphylococcus xylosus*. 5. Esterases.  
6. *Lactobacillus plantarum*. I. Arisi, Ana Carolina  
Maisonave. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.  
Título.

CDU 663





## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos e oportunidades.

À minha esposa Lílían, pelo amor, dedicação, segurança, paciência e privações. *Our time is about to begin.*

Aos meus pais Dulce e Marcos pelos exemplos e incentivo constante.

À professora Dra. Ana Carolina Maissonave Arisi, pelas oportunidades, orientação, estímulo, amizade e, principalmente, pela confiança.

Ao grande Dr. Javier Vernal pela solicitude, compreensão, estímulo e por todos os ensinamentos práticos e orientações.

À galera do Laboratório de Biologia Molecular do CAL, pela convivência afetuosa e descontraída. Às colegas Deise e Carla, que ensinaram mais com suas perguntas do que eu com minhas respostas.

Ao professor Dr. Hernán Terenzi, pelos “minutos de sabedoria” e pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos.

Ao professor Ernani Sant’Anna, pelo estímulo.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Alimentar, Eunice, Regina, Jaciara, Fabiano e Waldemar, pelos anos de ótima convivência.

Ao Jean Bertoldo, por compartilhar as angústias lipásicas e pela grande ajuda com a lipase de *S. xylosus*.

Aos grandes amigos Ismael, Eliseu e Luciano, pelos bate-papos memoráveis e momentos de descontração.

Às grandes amigas Ângela Fiorentini e Maristela Sawitzki, sempre presentes.

À CAPES e ao CNPq pelo financiamento.

À EMBRAPA CENARGEN, pelas análises de Espectrometria de Massa

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela oportunidade.





*Because something is happening here  
But you don't know what it is  
Do you, Mr. Jones?*

Bob Dylan

*For those about to rock  
We salute you!!*

AC/DC



**BROD, F.C.A.** Expressão, purificação e caracterização bioquímica de lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum*. 2010. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Esterases e lipases pertencem ao grupo das hidrolases e são enzimas que catalisam a clivagem e a síntese de ligações éster, sendo um grupo de enzimas biotecnologicamente relevantes com inúmeras aplicações em indústrias de alimentos, laticínios, detergentes e farmacêuticas. O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar em *Escherichia coli*, purificar e caracterizar bioquimicamente uma lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e uma esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum*. O gene da lipase (1084 pb) foi amplificado de uma cepa de *S. xylosus* isolada de salame fermentado naturalmente e introduzido no vetor de expressão pET14b para expressar a proteína fusão recombinante (lipase contendo a cauda de His<sub>6</sub>). A lipase recombinante de *S. xylosus* foi purificada por cromatografia de afinidade em um sistema HPLC. A lipase recombinante é um monômero em solução, como determinado pela cromatografia de exclusão molecular. Ela apresentou alta atividade em pH 9,0 e 42°C para acetato de *p*-nitrofenila e butirato de *p*-nitrofenila entre vários ésteres testados (pNPC<sub>2</sub>, pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>10</sub>, pNPC<sub>12</sub>, pNPC<sub>14</sub>, pNPC<sub>16</sub>, pNPC<sub>18</sub>). Além disso, apresentou uma interessante estabilidade térmica após incubação por 10 min a 95°C, mantendo 77 % de sua atividade inicial. O gene da esterase de *Lactobacillus plantarum* (1014 pb) foi amplificado e clonado no vetor de expressão pET14b para expressar em *Escherichia coli* a proteína contendo a cauda His<sub>6</sub>. A esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum* foi purificada em resina Ni-NTA e apresentou uma massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa. A enzima apresentou a atividade enzimática mais elevada em pH 6,0 e 40°C e preferência pelo butirato de *p*-nitrofenila, embora tenha hidrolisado mais eficientemente o acetato de *p*-nitrofenila. Além disso, este estudo apresenta, pela primeira vez, dados de difração circular sobre a estrutura secundária de uma esterase de *Lactobacillus plantarum*.

**Palavras-chave:** lipase, esterase, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus plantarum*.



**BROD, F.C.A.** Expression, purification and biochemical characterization of recombinant lipase from *Staphylococcus xylosus* and recombinant esterase from *Lactobacillus plantarum*. Thesis (Ph.D. in Food Science). Program of Post Graduation in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## ABSTRACT

Esterases and lipases belong to carboxylic ester hydrolases group that catalyze hydrolysis and synthesis of ester bonds, being a group of enzymes biotechnologically relevant with several applications in food, dairy, detergent and pharmaceutical industries. The lipase gene (1084 bp) was amplified from a *Staphylococcus xylosus* strain isolated from naturally fermented salami and introduced in pET14b expression vector in order to express the recombinant fusion protein (histidine-tagged lipase) in *Escherichia coli*. Recombinant histidine-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase was purified by affinity chromatography in a HPLC system. The histidine-tagged lipase is a monomer in solution, as determined by size-exclusion chromatography. It presented highest activity at pH 9.0 and 42°C for *p*-nitrophenyl acetate and *p*-nitrophenyl butyrate, among seven different esters assayed (pNPC2, pNPC4, pNPC10, pNPC12, pNPC14, pNPC16, pNPC18). Moreover, the enzyme presented a quite interesting thermal stability. After an incubation period of 10 min at 95°C, 77% of the initial activity was retained. The esterase gene (1014 bp) from *Lactobacillus plantarum* was amplified and cloned in pET14b expression vector to express a His6-tagged protein in *Escherichia coli*. Recombinant *Lactobacillus plantarum* esterase was purified by Ni-NTA resin and presented an apparent molecular mass of about 38 kDa. It presented highest activity at pH 6.0 and 40°C. Also, it presented preference for *p*-nitrophenyl butyrate, but hydrolyzed more efficiently *p*-nitrophenyl acetate. Besides, this study shows, for the first time, CD data about secondary structure of an esterase from *Lactobacillus plantarum*.

**Keywords:** lipase, esterase, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus plantarum*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Hidrólise de triacetina por esterase e lipase pancreática em função da concentração do substrato	30
Figura 2 Superposição das estruturas tridimensionais das lipases de <i>Rhizomucor miehei</i> e <i>Candida rugosa</i>	30
Figura 3 Representação esquemática do padrão de enovelamento tipo $\alpha/\beta$ hidrolase	34
Figura 4 Hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases	37
Figura 5 Organização da lipase de <i>Staphylococcus hyicus</i> como pré-pró-proteína.	38
Figura 6 Alinhamento das sequências maduras de lipases de <i>S. xylosus</i>	39
Figura 7 Alinhamento múltiplo parcial das formas maduras de lipases estafilocócicas	40
Figura 8 Representação esquemática da clonagem de um fragmento de DNA em um plasmídeo vetor	45
Figura 9 Mapa de restrição do vetor pET-14b	46
Figura 10 SDS-PAGE da purificação da lipase de <i>S. xylosus</i> em coluna HiTrap	60
Figura 11 Sequência de aminoácidos da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i>	61
Figura 12 Cromatografia por gel filtration da lipase de <i>S. xylosus</i> em coluna Superdex 200 Prep Grade	62
Figura 13 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i>	63
Figura 14 Termoestabilidade da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i> a 95°C	63
Figura 15 Atividade relativa da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i> para ésteres de <i>p</i> -nitrofenila de diferentes comprimentos de cadeia	64
Figura 16 Gráfico da cinética de Michaelis-Menten da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i>	65
Figura 17 espectro CD da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i> a 20°C	65
Figura 18 Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da esterase de <i>L. plantarum</i>	80
Figura 19 SDS-PAGE da purificação por resina de Ni-NTA da esterase recombinante de <i>L. plantarum</i>	81
Figura 20 Efeito do pH (a) e temperatura (b) na atividade da	82

esterase recombinante de *L. plantarum*

Figura 21 Gráficos de Michaelis-Menten da esterase recombinante de *L. plantarum*

**84**

Figura 22 Espectro do dicroísmo circular da esterase recombinante de *L. plantarum* em pH 6,0 e 40°C

**87**



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Detecção de peptídeos da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i> após digestão trípica por LC/MS	61
Tabela 2 Parâmetros cinéticos da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i> com pNPC <sub>4</sub>	64
Tabela 3 Parâmetros cinéticos da esterase recombinante de <i>L. plantarum</i>	84
Tabela 4 Efeito de ions metálicos, modificadores de aminoácidos, etanol e DMSO na atividade da esterase recombinante de <i>L. plantarum</i>	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHES – Ácido *N*-Ciclohexil-2-aminoetanosulfônico;  
DEPC – Pirocarbonato de dietila;  
DMSO – Dimetil sulfóxido;  
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético;  
EGTA – ácido etilenoglicol tetracético;  
IPTG – isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo;  
LB – meio Luria-Bertani;  
Ni-NTA – Resina de níquel-ácido nitriloacético;  
PAO – óxido de fenilarsina;  
PGO – hidrato de fenilglioxal;  
PIPES – Ácido 1,4-Piperazinadietanosulfônico;  
PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonila;  
SAL-1 – Lipase 1 de *Staphylococcus aureus*;  
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio;  
SEL-3 – Lipase 3 de *Staphylococcus epidermidis*;  
SHyL – Lipase de *Staphylococcus hyicus*;  
SWL – Lipase de *Staphylococcus warneri*;  
SWL-2 – Lipase 2 de *Staphylococcus warneri*;  
Tris – Tris(hidróximetil)aminometano;



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>27</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>29</b>
1.1 ESTERASES E LIPASES	29
1.2 ATIVAÇÃO INTERFACIAL	29
1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ESTERASES E LIPASES	31
1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE ESTERASES E LIPASES	34
1.5 MECANISMO ENZIMÁTICO	36
1.6 LIPASES ESTAFILOCÓCICAS	37
1.7 APLICAÇÕES DE LIPASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	42
1.8 <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i>	44
1.9 <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i>	44
1.10 ENZIMAS RECOMBINANTES	45
<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>51</b>
<b>2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE UMA LIPASE TERMOTOLERANTE DE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i></b>	<b>53</b>
2.1. INTRODUÇÃO	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.2.1 Cepas, plasmídeos e reagentes	55
2.2.2 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da lipase	55
2.2.3 Construção do vetor de expressão pET14b_lip	56
2.2.4 Expressão e purificação da lipase	56
2.2.5 Determinação do estado oligomérico da lipase recombinante por gel-filtração	57
2.2.6 Hidrólise de triglicerídeos	57
2.2.7 Atividade enzimática da lipase	57
2.2.8 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase	58
2.2.9 Especificidade por substrato	58
2.2.10 Parâmetros cinéticos	58
2.2.11 Ensaio de termoestabilidade	59
2.2.12 Espectroscopia de dicroísmo circular	59
2.3 RESULTADOS	59
2.3.1 Expressão e purificação da lipase recombinante de <i>S. xylosus</i>	60
2.3.2 Determinação do estado oligomérico da lipase recombinante	61
2.3.3 Atividade da lipase	62

2.3.4 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase	62
2.3.5 Especificidade por substrato	64
2.3.6 Parâmetros cinéticos	64
2.3.7 Espectroscopia de dicroísmo circular	65
2.4 DISCUSSÃO	66
2.5 CONCLUSÃO	68
2.6 AGRADECIMENTOS	69
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>71</b>
<b>3. CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E</b>	
<b>CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESTERASE DE</b>	
<b><i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i></b>	<b>73</b>
3.1 INTRODUÇÃO	73
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	74
3.2.1 Cepas, plasmídeos, meios e reagentes	74
3.2.2 Construção do pGEM-Est_Lpl	74
3.2.3 Construção do vetor de expressão pET14b-Est_Lpl	75
3.2.4 Expressão e purificação da esterase recombinante	75
3.2.5 Ensaio de Atividade Enzimática	76
3.2.6 Efeito do pH e temperatura na atividade da esterase	76
3.2.7 Especificidade por substrato	77
3.2.8 Parâmetros cinéticos	77
3.2.9 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade da esterase	77
3.2.10 Espectroscopia de dicroísmo circular	78
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.3.1 Clonagem e análise da sequência da esterase	78
3.3.2 Expressão e purificação da esterase recombinante	79
3.3.3 Atividade Enzimática	81
3.3.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade da esterase	81
3.3.5 Especificidade por substrato	83
3.3.6 Parâmetros cinéticos	83
3.3.7 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade da esterase	85
3.3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular	86
3.4. CONCLUSÕES	87
3.5 AGRADECIMENTOS	88
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO A – Hidrólise de triglicerídeos por <i>E. coli</i> expressando a lipase recombinante</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO B – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da esterase de <i>L. plantarum</i> (GQ497844.1) com outras proteínas</b>	<b>109</b>

## INTRODUÇÃO

Em 1999 a demanda mundial de enzimas representava 2,67 bilhões de dólares. Em 2004, essa demanda chegou a 3,7 bilhões, com uma perspectiva de mais de 5 bilhões para o ano de 2009 (HASAN et al., 2006). Dados recentemente publicados pelo grupo Freedonia (<http://www.freedoniagroup.com>) mostram que, em 2008, a demanda mundial de enzimas representou 5,1 bilhões de dólares, com uma perspectiva de 7 bilhões para 2013. Destes, 19 milhões foram oriundos de lipases.

A maior parte da indústria de enzimas é ocupada pelas enzimas hidrolíticas. As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) emergiram como enzimas cruciais na biotecnologia devido a suas múltiplas propriedades que encontraram utilização em uma ampla gama de aplicações (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

Lipases são um importante grupo de enzimas biotecnologicamente relevantes com inúmeras aplicações em indústrias de alimentos, laticínios, detergentes e farmacêuticas. Estas enzimas são amplamente produzidas por micro-organismos sendo que as lipases bacterianas desempenham um importante papel em aplicações comerciais (HASAN et al., 2006). A lipase de *L. plantarum* é particularmente importante na produção de compostos aromáticos muito desejáveis em embutidos (LOPES et al., 2002). Apesar de inúmeros trabalhos sobre clonagem e expressão de lipases microbianas recombinantes terem sido publicados até o momento, existe pouca informação sobre bactérias ácido lácticas como fontes de enzimas. Além disso, apesar de o papel dos *Lactobacilli* na produção de alimentos fermentados estar bem documentado e estudado pouca informação está disponível em relação às lipases de *Lactobacillus* spp. devido, provavelmente, a uma baixa produção destas enzimas por estes micro-organismos (VOGEL et al., 1990) especialmente quando comparados com *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (KENNEALLY et al., 1998). Lipases de bactérias ácido lácticas estão envolvidas no desenvolvimento do sabor/aroma e aroma de produtos fermentados (LOPES et al., 1999; LOPES et al. 2002). Não obstante, a capacidade lipolítica de *Lactobacillus plantarum* já foi demonstrada por Lopes et al. (1999) e uma lipase termoestável de *L. plantarum* foi caracterizada (LOPES et al., 2002). Como a sequência do genoma do *L. plantarum* WCFS1 foi completamente determinada (KLEEREBEZEM et al., 2003), é possível encontrar diversos genes de lipases e esterases ainda

não estudadas.

Rosenstein e Götz (2000) determinaram a sequência de nove genes de lipases de seis espécies de *Staphylococcus* incluindo lipase AF208229 de *S. xylosus* DSM20266. Até o presente momento, não existem publicações reportando a clonagem, purificação e caracterização desta enzima. Mosbah et al. (2005) purificaram e caracterizaram uma lipase de *S. xylosus* (AF701336) isolada de resíduo de uma indústria de óleos e determinaram a função de aminoácidos específicos através de mutagênese sítio-dirigida (MOSBAH et al., 2006; MOSBAH et al., 2007).

A caracterização molecular de cepas selvagens isoladas de salames artesanais de *L. plantarum* (SAWITZKI et al., 2007) e *S. xylosus* (FIORENTINI et al., 2009) foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Alimentar do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFSC. Além disso, a lipase aqui reportada foi clonada e sequenciada a partir do DNA de uma destas cepas selvagens de *S. xylosus* (PELISSER, 2008) no Laboratório de Biologia Molecular do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFSC.

Dessa forma, as características de lipases de *Staphylococcus xylosus* e de *Lactobacillus plantarum* podem ser de particular relevância, uma vez que uma lipase de um micro-organismo utilizado em alimentos poderia trazer novos avanços e vantagens, principalmente na utilização de lipases por indústrias de alimentos.



## **CAPÍTULO 1**



# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 ESTERASES E LIPASES

As esterases (E.C. 3.1.1) e lipases (E.C. 3.1.1.3) catalisam a hidrólise e a síntese de triacilgliceróis, sendo enzimas com ampla utilização na biocatálise (SECUNDO et al., 2006). Apesar de ocorrerem em inúmeras espécies de plantas, animais e micro-organismos, as lipases microbianas possuem um maior potencial industrial, sendo frequentemente mais úteis que enzimas de outras fontes devido à sua alta especificidade por substrato, regio e enantioseletividade, habilidade de permanecer ativa em solventes orgânicos, rendimento elevado e facilidade de manipulação genética (HASAN et al., 2006). Embora exista um considerável número de bactérias produtoras de lipases, poucas são exploradas comercialmente como linhagens selvagens ou recombinantes (GUPTA et al., 2004). Destas, as mais importantes são *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* e *Pseudomonas* (JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA et al., 2001; GUPTA et al., 2004).

Esterases e lipases são hidrolases (E.C. 3.1) que atuam, sob condições aquosas, nas ligações éster das carboxilas de ácidos graxos ligados ao glicerol. Esterases catalisam a hidrólise de ácidos graxos de cadeia curta (< que 10 carbonos) (CHOI et al., 2003), enquanto as lipases tem preferências por substratos de cadeia longa (> que 10 carbonos) e, portanto, insolúveis em água (JAEGER; EGGERT, 2002). Além disso, as lipases atuam na interface entre um substrato insolúvel e água, distinguindo-as das esterases, que atuam apenas em substratos hidrossolúveis. As lipases, todavia, também apresentam atividade para ésteres hidro-solúveis (SOLIMAN et al., 2007). Assim, os substratos naturais das lipases são triacilgliceróis de cadeia longa, que possuem baixa solubilidade em água. Além disso, sob condições micro-aquosas, lipases e esterases possuem a habilidade de realizar a reação inversa (GUPTA et al., 2004). Esta característica fez com que as lipases emergissem como enzimas chave na biotecnologia, pois várias reações podem ser catalisadas por estas enzimas: esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise, entre outras.

## 1.2 ATIVAÇÃO INTERFACIAL

Lipases são caracterizadas pelo drástico aumento de sua atividade quando atuam na interface lipídeo-água de substratos micelares ou emulsificados, fenômeno denominado ativação interfacial (JAEGER et al., 1999). Esterases, por outro lado, atuam apenas em substratos

hidrossolúveis, apresentando uma cinética de Michaelis-Menten (Figura 1).

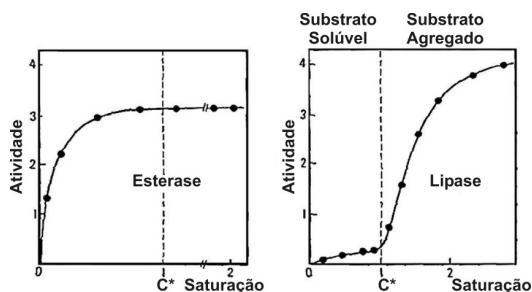


Figura 1: Hidrólise de triacetina por esterase e lipase pancreática em função da concentração do substrato (JAEGER et al., 1994, adaptado de SARDA; DESNUELLE, 1958).

O aumento da atividade catalítica na interface é resultado de rearranjos estruturais na região do sítio ativo. Segundo Jaeger et al. (1999), grande parte das lipases bacterianas possui uma estrutura tipo “tampa” cobrindo o sítio ativo, como ilustrado pela Figura 2. Esta estrutura pode ser constituída por uma ou duas hélices ou, ainda, por uma região de “loop”. Na ausência da interface lipídeo-água, esta estrutura cobre completamente o sítio ativo. Porém, quando o substrato está presente sob forma emulsificada ou micelar, uma mudança estrutural é iniciada, causando a abertura da “tampa” e a exposição de uma superfície hidrofóbica contendo o sítio ativo. Esta estrutura hidrofóbica interage, presumivelmente, com a interface lipídica (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000). Nem todas as lipases contudo apresentam ativação interfacial (JAEGER et al, 1999).

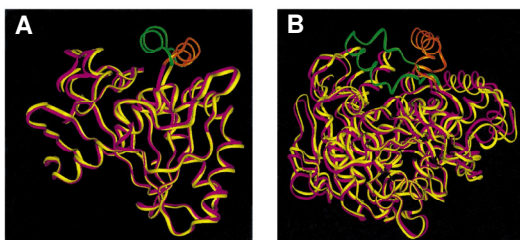


Figura 2: Superposição das estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* (A) e *Candida rugosa* (B). Os resíduos pertencentes à “tampa” estão coloridos de verde para a posição “fechada” e laranja/vermelho para a posição “aberta” (PETERSEN; FOJAN; PETERSEN, 2001).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ESTERASES E LIPASES

Geralmente, as lipases possuem pH ótimo variando da faixa neutra a alcalina, possuindo estabilidade sob uma ampla faixa de pH e temperatura. Uma lipase altamente termotolerante de *B. stearothermophilus*, reportada por Bradoo et al. (1999), possui uma meia vida de 15 a 25 min. a 100°C. Algumas características bioquímicas relevantes estão sumarizadas a seguir.

Com relação ao efeito de íons metálicos, cátions divalentes frequentemente estimulam a atividade enzimática de lipases (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000; GUPTA et al., 2004). Lipases isoladas de *B. subtilis* (LESUISSE et al., 1993), *B. thermoleovorans* (LEE et al., 1999), *P. aeruginosa* EF2 (GILBERT et al., 1991b), *S. aureus* (MURAOKA et al., 1982), *S. hyicus* (VAN OORT et al., 1989) e *P. fluorescens* JCM5963 (ZHANG et al., 2008) são estimuladas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . A lipase de *P. aeruginosa* 10145, por outro lado, é inibida na presença de íons cálcio. As lipases SCO1725 e SCO7513 de *Streptomyces coelicolor* (CÔTÉ; SHAREK, 2008) são levemente inibidas por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . A atividade enzimática de lipases é drasticamente inibida por metais pesados como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Sn}^{2+}$  e levemente inibida por  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Uma lipase de *B. subtilis* superexpressa na cepa *B. subtilis* BSL2 apresentou uma queda drástica de sua atividade na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  e um leve aumento na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (MA et al., 2006). A lipase SAL3 de *S. aureus* (MOSBAH et al., 2009) apresentou aumento da atividade na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como a lipase SXL de *S. xyloso* (MOSBAH et al., 2005).

Lipases possuem uma ampla especificidade por diferentes substratos, podendo, de maneira geral, ser divididas em três categorias: não específicas, régio específicas e ácido graxo específicas (GUPTA et al., 2004). As lipases não específicas atuam aleatoriamente na molécula de triglicerídeo, resultando na liberação de ácidos graxos e glicerol. Lipases de *S. aureus* e *S. hyicus* (JAEGER et al., 1994) pertencem a este grupo. Lipases régio específicas são enzimas 1,3-específicas, ou seja, hidrolisam preferencialmente ligações éster do carbono 1 e 3 da molécula de glicerol. Lipases de *Bacillus* sp. (LANSER; MANTHEY; HOU, 2002), *Bacillus* sp. THL027 (DHARMSTHITI; LUCHAI, 1999) e *Pseudomonas* sp. f-B-24 (YAMAMOTO; FUJIWARA, 1998), por exemplo, pertencem a este grupo. As lipases ácido graxo específicas exibem uma elevada especificidade por determinados ácidos graxos. *Achromobacterium lipolyticum* é a única lipase bacteriana conhecida que apresenta preferência por ácidos graxos específicos. Porém, lipases

de *Bacillus* sp., *P. alcaligenes* EF2 e *P. alcaligenes* 24 apresentam especificidade por triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa enquanto lipases de *Bacillus* sp. THL027, *P. aeruginosa* 10145, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. ATCC 21808 preferem triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia média ou curta. A lipase de *S. aureus* 226 apresenta uma preferência por ácidos graxos insaturados. A lipase SXL de *S. xylosus* não apresenta especificidade por substratos (MOSBAH et al., 2005) enquanto a lipase 2 de *S. warneri* (VAN KAMPEN et al., 2001) apresenta preferência por substratos de cadeia curta, assim como as lipases SAL-1 e SEL-3 (ROSENSTEIN; GOTZ, 2000). Outro grupo importante de lipases são aquelas denominadas enantio/estéreo específicas, ou seja, que apresentam a habilidade de discriminar entre os enantiômeros de um par racêmico. A maioria das lipases de *Pseudomonas* pertence a esta categoria.

A atividade de lipases e esterases pode ser afetada por uma variedade de compostos, principalmente inibidores. Inibidores não específicos são compostos que não atuam diretamente no sítio ativo da enzima, mas inibem a atividade pela mudança na conformação da lipase. Surfactantes, sais biliares e algumas proteínas pertencem a este grupo de inibidores (GUPTA et al., 2004). Porém, de maneira interessante, algumas lipases são tolerantes a determinados compostos reconhecidamente inibidores. A lipase de *P. fluorescens* JCM5963 (ZHANG et al., 2008) apresentou leve aumento na atividade na presença de Triton-X 100, mas foi completamente inibida por SDS. A lipase SAL-3 (MOSBAH et al., 2009) não apresentou diminuição na atividade na presença dos surfactantes Triton X-100, Tween-80, colato de sódio, taurocolato de sódio e dos detergentes Ariel, Axion e Omino Bianco. A lipase de *B. subtilis* (MA et al., 2006) apresentou uma aumento de 48 % na atividade na presença de 0,2 mM de taurocolato de sódio. Uma lipase de *Staphylococcus haemolyticus* L62 (BYUNG-CHUL et al., 2000) apresentou um aumento de 100 % na atividade na presença de taurocolato de sódio e 75 % na presença de Triton X-100. Sbarra et al. (1998) apresentou uma lipase clonada de células das glândulas mamárias de furão (*Mustela putorius furo*) ativada por sais biliares.

Inibidores específicos são compostos que interagem diretamente com o sítio ativo da enzima, podendo ser reversíveis ou irreversíveis. Inibidores reversíveis incluem derivados do ácido borônico (formam complexos reversíveis com a serina nucleofílica) e substratos análogos. Inibidores irreversíveis geralmente reagem com os aminoácidos do sítio ativo ou próximos a ele, inibindo assim a atividade catalítica (GUPTA et al., 2004). Inibidores de serina proteases, como fluoreto de

fenilmetilsulfonila (PMSF) e ácido fenilborônico, são inibidores específicos. As lipases SCO1725 e SCO7513 de *Streptomyces coelicolor* (CÔTÉ; SHAREK, 2008) são levemente inibidas pelo PMSF. Em contraste, a lipase de *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 não foi inibida por este composto (DHARMSTHITI et al., 1998).

Uma lipase extracelular isolada de *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 (LOPES et al., 2002) apresentou alta termoestabilidade, perdendo apenas 10 % de sua atividade após tratamento a 100°C por 30 min. Em relação a íons divalentes, cálcio reduziu a atividade enzimática, enquanto  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  aumentaram significativamente a atividade lipolítica. EDTA reduziu para 26 % a atividade da enzima. Por outro lado, uma lipase intracelular de *Lactobacillus plantarum* 2739 (GOBBETTI et al., 1996) não apresentou atividade enzimática após um tratamento térmico de 75°C por 2 min. Esta lipase foi significativamente inibida por  $Hg^{2+}$  e  $Ag^{2+}$  e moderadamente estimulada por  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ .

Uma esterase de *Lactobacillus helveticus* apresentou temperatura ótima para atividade na faixa de 35 a 40°C utilizando butirato *p*-nitrofenila como substrato, pH ótimo de 7,5 a 8,0 e preferência por substratos hidrossolúveis. Sendo uma esterase serina-dependente, os autores sugerem que o resíduo Ser-10 e His-164 são essenciais para a atividade catalítica (FENSTER et al., 2000).

Uma esterase intracelular de *Lactobacillus casei* LILA apresentou temperatura ótima de 30°C e pH ótimo de 5,5. Os substratos preferidos foram os que continham ácido graxos de 5 e 6 carbonos, não apresentando atividade para substratos com ácidos graxos maiores do que 12 carbonos (FENSTER et al., 2003).

Choi et al. (2004) reportaram a clonagem e caracterização de uma esterase de *Lactobacillus casei* CL96, a qual apresentou temperatura ótima de 37°C e pH ótimo de 7,0. Esta esterase apresentou maior seletividade para o substrato contendo 8 carbonos. Além disso, a enzima foi significativamente inibida por  $Hg^{2+}$  e  $Ag^{2+}$  e estimulada por  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ . Os compostos DEPC (pirocarbonado de dietila, modificador de histidina), PMSF (fluoreto de fenilmetasulfonila, modificador de serina) e PAO (óxido de fenilarsina, modificador de cisteína) inibiram fortemente a atividade enzimática, enquanto PGO (hidrato de fenilglioxal, modificador de arginina) causou apenas um leve decréscimo.

Apesar da purificação e caracterização de lipases e esterases provenientes de bactérias ácido-láticas já estarem descritas na literatura, nenhuma lipase/esterase de *Lactobacillus plantarum* foi expressa,

purificada, caracterizada molecular e bioquimicamente e nenhum estudo referente à sua estrutura foi publicado até o momento.

#### 1.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE ESTERASES E LIPASES

Devido à ampla variedade de possíveis utilizações de esterases e lipases bacterianas, estas enzimas têm sido extensivamente estudadas. Inúmeras esterases e lipases já tiveram suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos determinadas (ROSENSTAIN; GÖTZ, 1999; ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000; VAN KAMPEN et al. 2001; MOSBAH et al. 2005, BROD et al., 2010). Estruturas tridimensionais também estão disponíveis (DE SIMONE et al., 2001; TYNDALL et al., 2002; BUYEN et al., 2007; TIESINGA et al., 2007;). De acordo com Jaeger et al. (1999), a elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases por cristalografia de raios X proporcionou um maior entendimento do mecanismo de ação dessas enzimas. Estas enzimas apresentam um padrão de enovelamento conhecido como  $\alpha/\beta$  hidrolase, sendo que o núcleo é composto por uma superfície  $\beta$  central consistindo de até 8 fitas- $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) conectadas por até 6  $\alpha$ -hélices (A-F) (Figura 3) (JAEGER; REETZ, 1998).

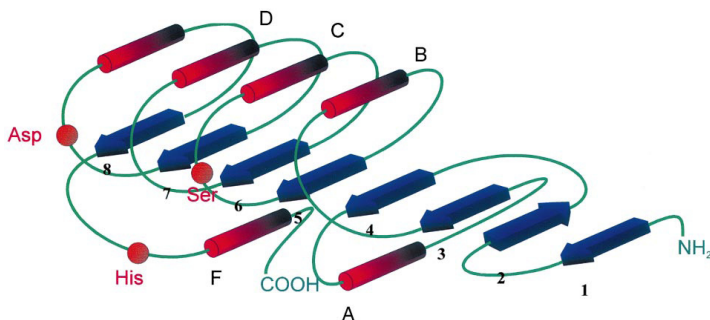


Figura 3: Representação esquemática do padrão de enovelamento tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase. As fitas  $\beta$  (1 – 8) estão representadas pelas setas azuis e as  $\alpha$ -hélices como cilindros vermelhos. As posições dos aminoácidos da tríade catalítica estão indicadas como esferas vermelhas (BORNSCHEUER, 2002).

O sítio ativo das  $\alpha/\beta$  hidrolases consiste de três resíduos catalíticos: um resíduo nucleofílico (serina, cisteína ou aspartato), um resíduo ácido catalítico (aspartato ou glutamato) e uma histidina, sempre nesta ordem na estrutura primária (JAEGER et al., 1999), porém distantes uns dos outros. Na estrutura terciária, contudo, eles estão arranjados próximos uns dos outros, constituindo assim a tríade



catalítica da enzima (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000). O nucleófilo encontrado na grande maioria das esterases e lipases é a serina, localizada na porção C-terminal, e o ácido catalítico pode ser tanto aspartato como glutamato. O resíduo de serina está localizado em um pentapeptídeo altamente conservado Gly-X-Ser-X-Gly. Em alguns casos esta sequência não é tão conservada (SVENDSEN, 2000), sendo uma glicina substituída por uma alanina, Gly-X-Ser-X-Ala ou Ala-X-Ser-X-Gly. Além disso, o pentapeptídeo G-X-S-X-G está geralmente localizado entre uma fita- $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice, compreendendo um giro acentuado determinado “cotovelo nucleofílico” (CHOI et al., 2004).

Outra importante característica estrutural destas enzimas é a cavidade do oxiânion. Esta estrutura é composta por dois resíduos que doam os prótons de sua cadeia amida para estabilizar o substrato no estado de transição. Um resíduo está localizado no cotovelo nucleofílico e, como consequência, sua cadeia amida está posicionada de forma idêntica na maioria das esterases e lipases (PLEISS et al., 2000). Por outro lado, o segundo resíduo não está localizado em uma região com sequência e estrutura conservada, mas em um *loop* no topo da folha  $\beta$  3. No trabalho de Pleiss et al. (2000), em todas as lipases analisadas, um resíduo de glicina que entra em contato com a cavidade nucleofílica é conservada. Pela classificação destes autores, existem dois tipos de cavidades de oxiânion: Gly**X** e GlyGlyGly**X**. No primeiro caso o **X** corresponde ao resíduo adjacente à extremidade C-terminal do resíduo de glicina e representa as enzimas que catalisam a hidrólise de substratos com cadeia média e longa. As lipases estafilocócicas possuem este tipo de cavidade do oxiânion, sendo que, neste caso, o resíduo **X** é geralmente uma fenilalanina. Nestas lipases, esta estrutura encontra-se na sequência bem conservada LVHGF. O segundo tipo de cavidade do oxiânion, GlyGlyGly**X**, cobre a família das carboxilesterases e lipases com especificidade para substratos de cadeia curta. Neste caso, o resíduo da cavidade de oxiânion, que pode ser uma Gly ou uma Ala, encontra-se deslocado em uma posição na direção C-terminal quando comparado ao tipo Gly**X**. O **X** é um resíduo hidrofóbico que na maioria das vezes é Phe, Leu ou Tyr. O alinhamento de algumas esterases bacterianas, incluindo a esterase de *L. plantarum*, sugere que o resíduo da cavidade do oxiânion nestas enzimas é precedido pelo motivo HGG, que é conservado nestes exemplos. Segundo Pleiss et al. (2000), apesar da estrutura da cavidade do oxiânion ser diferente para os tipos **GX** e **GGGX**, a posição do átomo de hidrogênio é similar, fazendo com que a função desta estrutura seja conservada.

## 1.5 MECANISMO ENZIMÁTICO

A atividade enzimática das esterases e lipases é dependente da tríade catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu. A reação de hidrólise do substrato ocorre em dois estágios (Figura 4). Ela começa com o ataque do oxigênio da hidroxila da serina nucleofílica na carbonila da ligação éster do substrato, ocorrendo a formação de um intermediário tetraédrico que, por sua vez, é estabilizado pelas ligações de hidrogênio formadas entre este e os grupos NH dos resíduos da cavidade do oxianion. A nucleofilicidade da serina é acentuada pelo resíduo de histidina, que recebe um próton daquele resíduo. Esta transferência é facilitada pela presença do resíduo ácido (aspartato ou glutamato), que orienta o anel imidazólico da histidina e neutraliza parcialmente esta carga.

A seguir, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster, que é então clivada. Neste estágio o componente ácido do substrato é esterificado à serina (formando um “intermediário covalente” ou intermediário acil enzima) enquanto a porção álcool é liberada. A próxima etapa é a deacilação, onde uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. A histidina ativa esta molécula de água pela remoção de um próton e a hidroxila resultante ataca a carbonila do grupo acil ligado covalentemente à serina.

Um segundo intermediário tetraédrico, carregado negativamente, é formado e estabilizado novamente pelas interações com os resíduos da cavidade do oxianion. A histidina doa um próton ao átomo do oxigênio da serina, a qual libera o ácido carboxílico. Após a difusão deste a enzima encontra-se pronta para uma nova reação (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

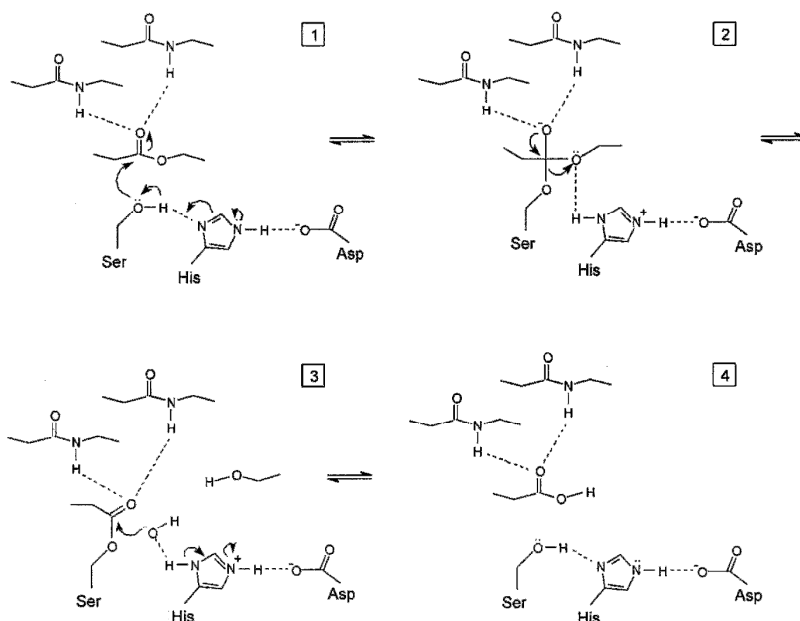


Figura 4: Hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. 1. Ligação do substrato, ativação da serina nucleofílica e ataque nucleofílico do grupo O<sup>-</sup> da Ser sobre a carbonila da ligação éster do substrato; 2. Formação do intermediário tetrahédrico e estabilização do O<sup>-</sup> pelos dois grupos NH dos resíduos da cavidade do oxânion; 3. Formação do intermediário acil-enzima, liberação do grupo álcool e ataque nucleofílico do grupo OH proveniente de uma molécula de água; 4. Doação de um próton da His para o oxigênio da Ser, quebra da ligação éster e liberação do produto (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

## 1.6 LIPASES ESTAFILOCÓCICAS

A atividade lipolítica de *Staphylococcus* é descrita desde 1901 (GÖTZ et al., 1998). Segundo estes autores, nos anos 80 várias lipases de *S. aureus* foram purificadas e caracterizadas. Rosenstein e Götz (2000) determinaram a sequência de nove genes de lipases de seis espécies de *Staphylococcus* incluindo *S. xylosus* AF208229. Todas estas lipases são organizadas como pré-pró-proteínas, com as regiões “pré” correspondendo a um peptídeo sinal de 35-38 aminoácidos, um pró-peptídeo com características hidrofílicas de 207-321 aminoácidos e um peptídeo maduro de 383-396 aminoácidos (Figura 5). Dessa forma,

essas lipases são secretadas como pró-proteínas, sendo processadas à forma madura por proteases específicas.

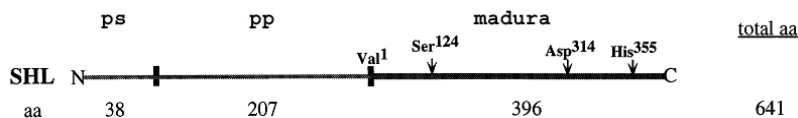


Figura 5: Organização da lipase de *Staphylococcus hyicus* como pré-pró-proteína. **ps**: peptídeo sinal; **pp**: pró-peptídeo; **madura**: lipase madura. Ser<sup>124</sup> – Asp<sup>314</sup> – His<sup>355</sup>: tríade catalítica. Fonte: Götz et al. (1998).

As funções dos pré e pró-peptídeos ainda não estão completamente desvendadas. O pré-peptídeo parece estar envolvido no processo de secreção da proteína e resultados sugerem que o pró-peptídeo possui duas funções: envolvimento na translocação da proteína e estabilização contra degradação proteolítica (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006).

Mosbah et al. (2005) purificaram e caracterizaram uma lipase de *S. xylosus* (AF701336) isolada de resíduo de uma indústria de óleos. Segundo estes autores, a enzima de 43 kDa mostrou-se capaz de hidrolisar triacilgliceróis sem especificidade por tamanho de cadeia lateral. Além disso, esta lipase não apresentou ativação interfacial. A sequência desta enzima apresentou 53 % de similaridade com outra lipase de *S. xylosus* (AF208229) previamente sequenciada (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000) (Figura 6).

Pela comparação de sequências de lipases estafilocócicas, torna-se evidente a conservação dos resíduos de serina, aspartato e histidina em posições correspondentes àsquelas da tríade catalítica de outras lipases (Figura 7). Além disso, o pentapeptídeo que flanqueia a serina nucleofílica é também altamente conservado nas sequências de lipases estafilocócicas (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

As lipases SAL-1, SEL-3, SHyL e SWL requerem Ca<sup>2+</sup> para atividade enzimática máxima, sendo que o EDTA e o EGTA atuam como inibidores destas lipases, para as quais o cálcio é, provavelmente, necessário para estabilização da estrutura tridimensional durante a catálise (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000). SAL-1 e SEL-3 possuem pH ótimo próximo a 6, sendo inativadas em valores de pH superiores a 10. Esta preferência não é comum para lipases bacterianas, que apresentam sua atividade máxima em pHs alcalinos, como por exemplo a SHyL, que apresenta pH ótimo de 8,5 (VAN OORT et al., 1989). Em relação à especificidade por substrato, SAL-1 e SEL-3 preferem triglicerídeos com



SAL-1	1	KCQYKNQDP	VLVHG	FNGH	TDD	IN	SP	IL	-	AH	WGG	KMN	IRQ	DL	EN	G	KAYE	AS	ISAF																																							
SEL-3	1	KKQYKNND	PI	LVHG	FNGH	TDD	IN	SP	VL	-	TH	WGG	KMN	IRQ	DL	EN	G	BAYE	ASISAF																																							
SXL	1	KCQYKNQDP	IL	LVHG	FNGH	TDD	IN	PA	VL	-	AH	WGG	K	NI	RQ	DL	EN	G	YETVEASV																																							
SWL	1	PQOQYKNH	DP	IL	LVHG	FNGH	TDD	IN	PA	VL	-	DS	NY	WGG	ER	LN	T	Q	EAFKGYNVSEASVSAL																																							
SHyL	1	NPEYKNK	DP	FV	EHG	FT	G	VE	VA	KG	-	NE	WGG	K	AN	EN	HL	E	KAGVETVEASVSAL																																							
SHaL	1	KSNQYKN	KYP	V	LVHG	FL	GL	VD	NA	PA	TY	-	PN	WGG	K	FP	V	KRL	EKLGYDVHVEASVGAf																																							
SEL-2	1	AQOQYK	QY	P	V	FV	HG	F	V	L	G	E	D	A	F	S	M	Y	-	PN	WGG	K	RY	N	VE	KEL	TKL	G	Y	R	V	H	E	A	N	V	GA	F																				
SAL-2	1	NOV	PL	A	K	Y	P	V	FV	HG	FL	GL	VD	NA	PA	TY	-	PN	WGG	K	EN	F	K	Y	N	VE	KEL	TKL	G	Y	R	V	H	E	A	N	V	GA	F																			
consensus	1	kq	qy	kN	d	P	i	v	L	V	H	G	F	n	G	f	g	d	i	a	p	a	p		ny	W	G	G	k	m	n	i	r	g	d	i	e	k	n	G	y	e	v	y	e	a	s	a	f		+							
SAL-1	60	GSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	R	V	D	Y	G	A	A	H	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	V	H	L	V	G	H	S	M	G	G								
SEL-3	60	GSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	R	V	D	Y	G	A	A	H	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	I	H	L	V	G	H	S	M	G	G								
SXL	60	SSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	T	V	D	Y	G	A	A	H	A	E	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	I	H	L	V	H	S	M	G	G									
SWL	61	GSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	T	V	D	Y	G	A	A	H	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	I	H	L	V	G	H	S	M	G	G								
SHyL	59	ASNH	RAVEL	Y	Y	I	K	G	R	V	D	Y	G	A	A	H	SE	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	I	H	L	V	H	S	M	G	G									
SHaL	60	SSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	K	V	D	Y	G	A	A	H	A	T	G	H	D	R	Y	G	E	Y	G	I	M	P	D	E	P	G	K	I	H	L	V	G	H	S	M	G	G														
SEL-2	60	SSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	R	V	D	Y	G	A	A	H	A	A	K	Y	R	Y	G	E	Y	G	I	M	P	D	E	P	G	K	I	H	L	V	G	H	S	M	G	G															
SAL-2	60	GSNYDRAVEL	Y	Y	I	K	G	R	V	D	Y	G	A	A	H	A	A	K	Y	G	H	E	R	Y	G	K	T	V	E	G	I	Y	K	D	W	K	P	G	Q	K	I	H	L	V	G	H	S	M	G	G								
consensus	61	g	S	N	y	d	r	a	v	e	l	y	y	i	k	g	r	v	d	y	g	a	a	h	a	a	k	y	h	e	r	y	g	k	t	v	e	g	i	y	k	d	w	k	p	g	q	k	v	h	l	v	g	h	s	m	g	g
SAL-1	120	QTI	R	Q	L	E	E	L	R	N	G	N	E	E	I	Y	Q	K	H	G	G	E	I	S	P	L	F	K	G	N	D	N	M	I	S	I	T	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A						
SEL-3	120	QTI	R	Q	L	E	E	L	R	N	G	N	E	E	I	Y	Q	K	H	G	G	E	I	S	P	L	F	K	G	N	D	N	M	I	S	I	T	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A						
SXL	120	QTI	R	Q	L	E	E	L	R	N	G	N	E	E	I	Y	Q	K	H	G	G	E	I	S	P	L	F	K	G	N	D	N	M	I	S	I	T	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A						
SWL	121	QTI	R	L	E	E	M	L	R	N	G	N	E	E	I	Y	Q	K	H	G	G	E	I	S	P	L	F	K	G	N	D	N	M	I	S	I	T	T	L	A	S	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A							
SHyL	119	QTI	R	L	L	B	H	L	F	G	D	A	E	I	A	Y	Q	K	H	G	G	E	I	S	E	L	F	K	G	Q	D	N	M	I	S	I	T	T	L	A	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A						
SHaL	120	QTI	R	L	L	B	H	L	F	G	D	A	E	I	Y	Q	K	A	H	G	G	E	I	S	E	L	F	K	G	Q	D	N	M	I	S	I	T	T	L	A	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A						
SEL-2	120	QTI	R	L	L	B	H	L	R	N	G	N	E	E	I	Y	Q	K	A	H	G	G	E	I	S	E	L	F	K	G	Q	D	N	M	I	S	I	T	T	L	G	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A					
SAL-2	120	QTI	R	L	L	E	E	F	L	R	N	G	N	E	E	I	A	H	K	A	H	G	G	E	I	S	E	L	F	K	G	Q	D	N	M	I	S	I	T	T	L	A	T	P	H	N	G	T	H	A	S	D	L	A				
consensus	121	Q	T	i	r	l	l	e	e				e	e	i	e	r	q	k	h	g	g	e	i	s	p	l	f	k	g	n	d	n	m	i	s	i	t	t	l	g	t	p	h	n	g	t	h	a	s	d	l	a					

SAL-1	180	GNEALVRQIVEDI	IGKVF	GNKNSRVDFGLQWGLKQKP	PNESYIDYV	KRVKQSNL	MKSKDNG
SEL-3	179	GNEALVRQIA	LDGK	YGNDSRVDFGLQWGLKQKP	PNESYI	QVVRVQNS	KLWSKDSG
SXL	179	GNEALVRQAL	LDYKFK	GNKNSRVDFGLQWGLKQKP	RECEVYAC	YVQVQNS	GLMKWEDNG
SWL	180	GNEALVRQAL	LDYKFK	SGENKFSRLGLQWGLKQKP	RECEVYAC	YVQVQNS	GLMKWEDNG
SHYL	178	GNTPTTRENIL	SAQSSHLG	HDGDMHGRKRRCESL	DYDKRI	ABSKITD	SEDTG
SHaL	179	GNTDFVYVLI	IRIGRUS	GNKYSHIDLGFQWGRKQRP	PNESYIDYV	KRVKRVANSKI	WKTQDSA
SEL-2	179	GSTKFIAD	TINRI	GKIGTALDDELGFQWGRKQRP	PNESYIDYV	KRVKRVANSKI	WKTQDSA
SAL-2	179	GNEAFVRIK	IMEALNFM	GNRYSNLGLQWGRKQRP	PNESYIDYV	KRVKRVANSKI	WKTQDSA
consensus	181	Gn	alv	qiv	fd	ig	km gnk srvd GltqWg KqkpnEsyidYvkrV nsklwKseDng
SAL-1	240	FVDLTREGAT	LDNRK	TSLNPNIVKTYTGE	THKALNSDRQ	ADL	MPFPEVITGNIGK
SEL-3	239	FVDLTREGAT	LDNRK	TSLNPNIVKTYTGE	STHKTLAG	KQKADL	NLMFLETTITGNIGK
SXL	239	FVDLTREGAA	KLNK	TSLNPNIVKTYTGE	STPTLFG	NOQSD	NLMFLETTITGNIGK
SWL	240	FVDLTREGA	QELN	NHTSLNPNIVKTYTGE	SSDPDKRG	IHER	SHNIXILPTINIGK
SHYL	237	FVDLTREGAEK	INOK	TELNPNIVKTYTGA	THETQLG	KHIADL	QMEFTKILITGNIGK
SHaL	239	FVDLTREGSEK	LNOM	TSLNPNIVKTYTGE	LDTHITPLG	NENPN	IRQFFLDHSRLIGR
SEL-2	239	VNDLTTTGA	EKLNO	MTLNPNIVKTYTGA	THITCPLG	NEVNP	IRQFFLDHSRLIGR
SAL-2	239	AVDLTTTGA	SAKLNM	MTSLNPNIVKTYTGE	SSHTCPLG	YENPD	LGTFFLMATSRIGR
consensus	241	lypDLTreGa	kiNnkTsl	nPNivKtytGesth a lg	k dl mff f itgnliGk		
SAL-1	300	ATEKEWREND	GLVSV	ISSQHF	FNOA	YVTKATD	KIQKGIQVTPTKHWDHVDVFGQDS
SEL-3	298	AKEKEWREND	GLVSV	ISSQHF	FNOA	YVTKATD	KNCKGVMQVTPTKHWDHVDVFGQDS
SXL	298	AAKEWREND	GLVSV	ISSQHF	FNOA	YVTKATD	EVKKGVMQVTPTKHWDHVDVFGQDS
SWL	299	LDFQAMREND	GLVSV	ISSQHF	FNOA	YVTKATD	QIQKGVQVTPVQCHDWDHVDVFGQDS
SHYL	296	VDLILAFREND	GLVSE	ISSQHPS	DEKNI	SDENS	ELHKGVMQVTPTKHWDHVDVFGQDS
SHaL	298	DNVNVRKND	GLVPV	SSSLFET	TNQAKTYPT	FTT	KGIQKGVPMNGMDHLDVFGQDA
SEL-2	298	DANKEVREND	GLVPV	SSSLHPS	DEKNI	SDENS	ELHKGVMQVTPVQYDWDHLDVFGQDA
SAL-2	298	DARBEWREND	GLVSV	ISSLHPS	NOFFVFN	TNDEPATRE	KGIQKGVPMQVTPVQYDWDHVDVFGQDS
consensus	301	dekewReND	GLVsvIssqhpsnca	yveatd i kGiQVTPi	h	WDHvDfvGqds	

Figura 7: Alinhamento múltiplo parcial das formas maduras de lipases estafilocócicas. Os resíduos marcados com (+) provavelmente formam a tríade catalítica. SAL-1: lipase de *S. aureus* NCTC 8530; SEL-3: lipase de *S. epidermidis* RP62A; SXL: lipase de *S. xyloso* DSM20266; SWL: lipase de *S. warneri*; SHYL: lipase de *S. hyicus*; SHaL: lipase de *S. haemolyticus*; SEL-2: lipase de *S. epidermidis* 9; SAL-2: lipase de *S. aureus* PS54 (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

## 1.7 APLICAÇÕES DE LIPASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Hoje, a modificação de óleos e gorduras é uma área de grande importância no processamento de alimentos, sendo que óleos com triacilgliceróis estruturados e propriedades físico-químicas alteradas possuem um grande potencial na indústria de alimentos. Lipases microbianas regio-específicas e ácido graxo-específicas são pesquisadas com a finalidade de modificar óleos vegetais. Óleos de qualidade inferior podem ser modificados para sintetizar triacilgliceróis estruturados, triacilgliceróis de baixa caloria e óleos enriquecidos com ácido oleico. Modificações mediadas por lipases são proeminentes na indústria de óleos, uma vez que modificações enzimáticas são específicas e pode ser executadas em condições moderadas (GUPTA et al., 2003). Reddy et al. (2005) apresentaram a transesterificação de fosfatidilcolina com os ácidos palmítico e esteárico realizada pelas lipases comerciais Novozym 435 (lipase imobilizada de *Candida antarctica*) e Lipozyme TM IM (lipase de *Thermomyces lanuginosa*).

Lipases têm sido adicionadas em alimentos para modificação do sabor/aroma através da síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois. Larios et al. (2004) demonstrou que a fração B da lipase de *C. antarctica* pode ser empregada como um agente biocatalisador em reações de esterificação devido às altas taxas de conversão obtidas na síntese de ésteres de cadeia curta. Lipases imobilizadas de *Staphylococcus warneri* e *S. xylosus* catalisaram a síntese de ésteres como hexanoato de etila e laurato de etila (TALON; MONTEL; BERDAGUE, 1996). A lipase de *Candida cylindracea* já foi utilizada com sucesso na produção de butirato de etila (CHEN, 1996). Uma lipase de *Rhizopus oryzae* produziu acetato de butila em um meio livre de solvente (SALAH et al., 2007). Lipases recombinantes de *Staphylococcus epidermidis* produziram vários ésteres de cadeia média, ésteres de geranila e ésteres insaturados em meio aquoso, evitando assim as desvantagens da produção de ésteres em meio orgânico (CHANG; CHOU; SHAW, 2001). A lipase imobilizada de *Staphylococcus simulans* catalisou a esterificação entre ácido acético e álcool isoamílico e sintetizou o acetato de isoamila em meio aquoso sem a adição de qualquer solvente orgânico (GHAMGUI et al., 2006). Acetato de isoamila foi igualmente sintetizado pela lipase imobilizada de *C. antarctica* em sistema contendo solvente orgânico (ROMERO, et al., 2005). A lipase comercial Palatase 20 000 L sintetizou butanoato de etila em meio aquoso e sob condições que simulam a cura do queijo (LIU; HOLLAND; CROW, 2003). Macedo, Lozano e Pastore (2003) demonstraram a síntese de ésteres de citronelila por esterificação e



transesterificação com uma lipase de *Rhizopus* sp. Lubary et al. (2009) demonstrou a produção de vários etil ésteres de ácidos graxos através da etanolise de triglicerídeos do leite pela ação enzimática da lipase comercial Novozym 435.

As lipases têm sido utilizadas na produção de produtos cárneos sem gordura, principalmente em produtos de pescado. Essa gordura é removida durante o processamento pela adição de lipases em um processo denominado de biolipólise. As lipases também desempenham um importante papel nas etapas fermentativas da produção de embutidos cárneos, determinando mudanças na liberação de ácidos graxos de cadeia longa durante a etapa de cura. Lipases de diferentes micro-organismos já foram utilizadas com sucesso na melhora do sabor/aroma de produtos de arroz, na modificação de leite de soja e para melhorar o aroma e acelerar a fermentação de vinhos de maçã. As lipases são, igualmente, muito utilizadas na indústria de laticínios na hidrólise das gorduras do leite. Aplicações atuais incluem a melhora no sabor/aroma e aceleração da cura de queijos, elaboração de produtos “tipo queijo” e a lipólise da gordura da manteiga e do creme de leite. Os ácidos graxos liberados pela ação das lipases na gordura do leite conferem aos produtos lácteos aromas característicos, principalmente em queijos leves. Assim, a adição de lipases que liberam ácidos graxos de cadeia curta (principalmente C4 e C6) leva ao desenvolvimento de aromas acentuados e penetrantes ao produto. Além disso, os ácidos graxos livres são convertidos pela população microbiana presente nos queijos, iniciando a síntese de ingredientes formadores de aromas como acetoacetato,  $\beta$ -cetoácidos, metilcetonas, ésteres e lactonas (HASAN et al., 2006). Nesse sentido, a Novozymes comercializa, para a produção de queijos italianos, uma lipase 1,3 específica isolada de *Mucor miehei* que tem preferência por hidrolisar ácidos graxos de cadeia curta.

As lipases possuem um papel importante na preparação dos chamados queijos enzimaticamente modificados. Estes queijos são incubados na presença de enzimas a elevadas temperaturas, produzindo sabor/aroma concentrado para serem utilizados, posteriormente, como ingrediente em outros produtos como molhos, recheios, sopas, lanches e outros (HAGBERG; HAISLIP; JOHNSON, 1988; MOOSAVI-NASAB; RADHI; JOUYBARI, 2010).

A qualidade do chá preto depende da desidratação, quebra mecânica e fermentação enzimática aos quais as plantas de chá são submetidas. Durante a manufatura do chá preto, a decomposição enzimática dos lipídeos de membrana inicia a formação dos produtos

voláteis com aromas característicos, enfatizando a importância dos lipídeos no desenvolvimento do sabor/aroma. A lipase produzida por *Rhizomucor miehei* aumentou o nível de ácidos graxos poliinsaturados na produção de chá preto (LATHA et al., 1999).

A fermentação de *Candida utilis* na presença de extrato de carne ou óleo de manteiga e lipases, seguida de *spray-drying* produziu leveduras com aroma cárneo ou de queijo azul. A levedura melhorada pode ser utilizada na produção de bebidas alcoólicas com sabores/aromas melhorados (SHAY; FISCHER, 1991).

### 1.8 *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

*Lactobacillus plantarum* pertence a um grupo de bactérias denominadas bactérias ácido-láticas (BAL). Gram-positivas, não formadoras de esporos e anaeróbias, estas bactérias são tradicionalmente aplicadas na conservação de uma variedade de alimentos fermentados (HOLZAPFEL et al., 2001). O maior grupo de BAL pertence ao gênero *Lactobacillus*, que por sua vez compreende mais de 50 espécies. Em muitos casos, estas bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação industrial e artesanal, uma vez que contribuem para a conservação, desenvolvimento de sabor/aroma e textura de alimentos fermentados (DE VRIES et al., 2006). *L. plantarum* é uma bactéria versátil encontrada em uma variedade de nichos ambientais como produtos lácteos, cárneos e vegetais. Além disso, é frequentemente encontrada como habitante natural do trato gastrointestinal humano (KLEEREBEZEM et al., 2003).

### 1.9 *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS*

*Staphylococcus xylosus* é uma bactéria do grupo dos estafilococos coagulase negativa que é comumente isolada de produtos cárneos fermentados (MOROT-BIZOT et al., 2003; IACUMIN et al., 2006; RANTSIOU et al., 2005; SIMONOVÁ et al., 2006; KOZACINSKI et al., 2008) e de plantas processadoras de alimentos (MOROT-BIZOT et al., 2006). Além disso, é utilizado, assim como *L. plantarum*, como culturas iniciadoras na manufatura de produtos lácteos e cárneos fermentados (MONTEL et al., 1996). Nestes produtos, *Staphylococcus* ssp são responsáveis pela redução dos nitratos a nitritos, levando à formação da nitrosomioglobina e consequente estabilização da cor do produto (SIMONOVÁ et al., 2006). Contribuem ainda com a prevenção da oxidação lipídica pela ação de catalases que decompõe o peróxido de hidrogênio (TALON et al., 1999; IACUMIN et al., 2006). Além disso, *Staphylococci* liberam lipases que hidrolisam ácidos graxos, formando

compostos voláteis responsáveis pelo aroma de salames fermentados (MONTEL et al., 1996). A atividade lipolítica de cepas de *S. xylosus* isoladas de salame naturalmente fermentado foi recentemente demonstrada por Fiorentini et al. (2009).

### 1.10 ENZIMAS RECOMBINANTES

Muitas proteínas de interesse são normalmente expressas em concentrações muito baixas no organismo original, como é o caso das enzimas lipolíticas de *Lactobacilli* (VOGEL et al., 1990). Assim, a expressão heteróloga destas proteínas, através da tecnologia do DNA recombinante, é uma opção para a produção de altas concentrações da enzima de interesse.

Para a obtenção de uma proteína pura a partir de uma sequência de DNA, algumas etapas são necessárias: isolamento do gene que codifica a proteína de interesse, a clonagem deste gene em um vetor de expressão, a expressão da proteína em forma solúvel, purificação e determinação de seu grau de pureza.

A inserção de um sítio de restrição nas extremidades da sequência de DNA a ser clonada é uma estratégia frequentemente utilizada para a clonagem de um gene em um vetor. Este vetor é então aberto (com a enzima de restrição que reconhece o mesmo sítio inserido no DNA a ser clonado) e incubado com o DNA de interesse na presença da enzima DNA ligase, que por sua vez realiza a ligação entre o vetor e a sequência de interesse (Figura 8).

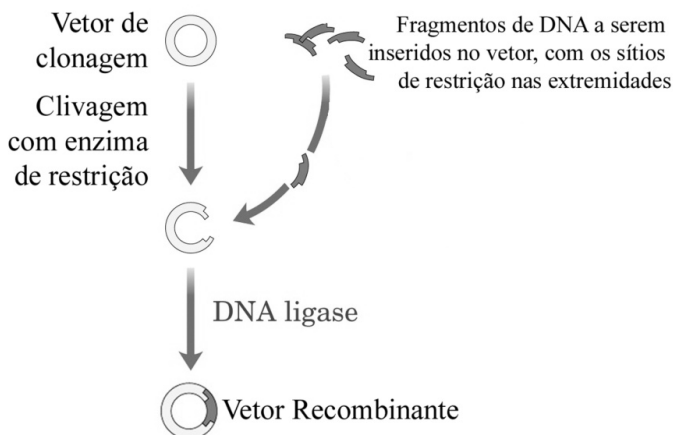


Figura 8: Representação esquemática da clonagem de um fragmento de DNA em um plasmídeo vetor. Adaptado de Lehninger (2000).

Os sistemas de expressão mais comumente utilizados são os baseados nos vetores pET (GRASLUND et al., 2008; Merck/EMD, The pET system manual, 2006), que dirige a expressão de um DNA recombinante sob controle do promotor da T7 RNA polimerase, que por sua vez é induzida por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Como exemplo, o mapa de restrição do vetor pET-14b é apresentado na Figura 9. Outra vantagem da clonagem em vetores pET é a expressão da proteína de interesse fusionada com uma cauda de polihistidina, que permite sua purificação em um sistema simples.

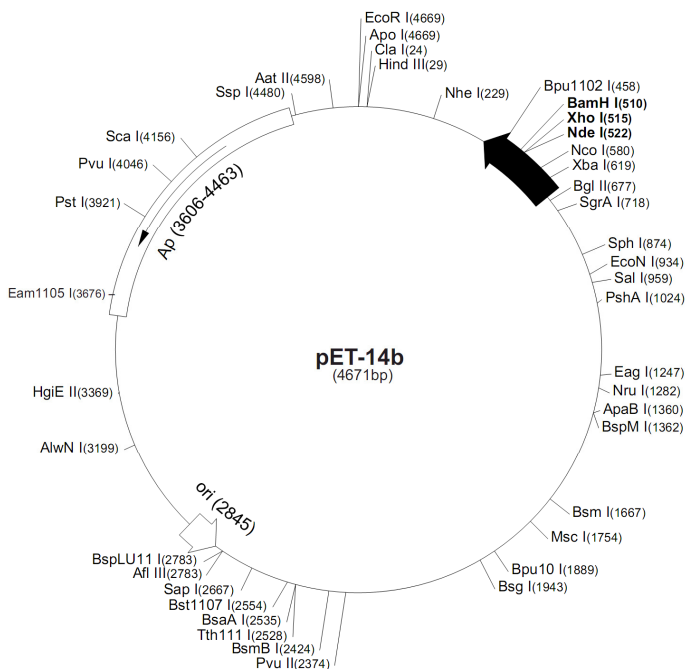


Figura 9: Mapa de restrição do vetor pET-14b (The pET system manual, 2006).

Após a clonagem no vetor de expressão, a proteína deve ser expressa em um hospedeiro apropriado. Hospedeiros procariotos são, na maioria das vezes, adequados para expressão de proteínas heterólogas, sendo algumas cepas de *Escherichia coli* as mais comumente utilizadas. Assim, para superexpressão de proteínas recombinantes a cepa BL21 (DE3) é bastante apropriada (GRASLUND et al., 2008).

Uma vez expressa, a proteína deve então ser purificada. A expressão em vetores pET produz uma proteína fusionada com uma cauda de afinidade de 6 histidinas, permitindo a purificação através de

um protocolo relativamente simples de cromatografia de afinidade por metal ( $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ ). Além disso, as caudas de histidina, por serem pequenas, raramente afetam as características da proteína, como solubilidade e cristalização (WAUGH, 2005; CARSON et al., 2007). Segundo Derewenda (2004), as vantagens da utilização de proteínas recombinantes incluem um aumento significativo no rendimento da proteína e facilidade de purificação quando da utilização das caudas de afinidade. De acordo com Arnau et al. (2006), a purificação de proteínas fusionadas com caudas de afinidade resulta frequentemente em rendimentos superiores a 90 % e em um reduzido número de etapas de purificação. Além disso, a presença deste tipo de cauda permite a purificação de praticamente qualquer proteína sem nenhum conhecimento prévio de suas propriedades bioquímicas. Este autor apresenta como exemplo a purificação de uma piroglutamil aminopeptidase (pGAP) de *Bacillus amyloliquefaciens*. Para isso, pGAP foi produzida em *E. coli* com e sem cauda de polihistidina. Para a proteína sem cauda o processo de purificação incluiu precipitação por sulfato de amônio, duas etapas de separação consecutivas utilizando fenil-Sefarose e uma etapa final utilizando Q Sefarose HP. Mesmo após a otimização destas etapas, várias bandas ainda eram observadas no SDS-PAGE. Além disso, medidas de atividade mostraram uma recuperação de 40 % neste processo, com significativas perdas de proteína nas etapas 1 e 3. Para a pGAP fusionada com cauda de polihistidina (HT-pGAP), uma única etapa de purificação por cromatografia de afinidade resultou em uma proteína pura e com um rendimento de processo de 96 % sem qualquer otimização. Esse ensaio e inúmeros outros trabalhos (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000; LOPES et al., 2002, RHEE et al., 2005; VERNAL et al., 2007; YAO et al., 2008; SOLIMAN et al., 2007; QUINTANA-CASTRO et al., 2009) evidenciam outra vantagem da produção de proteínas recombinantes, o alto grau de pureza obtido após etapas simples de purificação.

Várias lipases já foram clonadas e superexpressas, incluindo lipases estafilocócicas. Mosbah et al. (2005) purificaram uma lipase extracelular de *S. xylosus* a partir do caldo da fermentação da cepa e obtiveram uma recuperação de 11,6 % em atividade após várias etapas de purificação. Em seguida, o mesmo grupo (Mosbah et al., 2006) clonou e expressou em *E. coli* BL21 (DE3) a mesma enzima e obteve uma recuperação de 66 % em atividade após uma única etapa de purificação. A análise por SDS-PAGE mostrou uma única banda após a migração. Além disso, a quantidade em enzima obtida foi aproximadamente 3 vezes superior à quantidade obtida na purificação a

partir do caldo de cultura. Uma lipase de *S. epidermidis* (SIMONS et al., 1998) foi clonada, expressa em *E. coli* e purificada. Duas etapas de purificação (cromatografia de afinidade e gel filtração) foram suficientes para obtenção da proteína pura. A lipase 2 de *S. warneri* (SWL2) foi clonada, expressa em *E. coli* e purificada após duas etapas de purificação (VAN KAMPEN et al., 2001). Uma nova lipase de *P. fluorescens* JCM5963 recentemente caracterizada (ZHANG et al., 2009) foi clonada, expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade. Esta purificação apresentou rendimentos de 57 % em proteína pura. Uma lipase de *Serratia marcescens* foi clonada e expressa em *E. coli* por Long et al. (2007). A produção desta lipase aumentou de 150 U/L para 5000-6000 U/L após a otimização da indução com IPTG.

Esterases já foram igualmente expressas em sistemas heterólogos. Em um interessante trabalho, Rhee et al. (2004) expressaram em *E. coli* o gene de uma esterase termofílica e termoestável clonado de uma biblioteca genômica. Este gene foi clonado no vetor pET-22a, expresso em *E. coli* BL21 (DE3) e purificado em resina Ni-NTA e sua expressão apresentou um rendimento de mais de 4 mg de proteína a partir de 1 L de cultura. Uma esterase de *Lactobacillus casei* CL96 foi clonada no vetor pET-29a e superexpressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (CHOI; MIGUEZ; LEE, 2004). Fenster, Parkin e Steele (2003) clonaram uma esterase intracelular de *Lactobacillus casei* LILA. A proteína foi expressa em *E. coli* e purificada em resina Ni-NTA, porém os autores não apresentam dados referentes ao rendimento da purificação. O gene de uma esterase de *Geobacillus thermoleovorans* isolado do deserto do Egito foi clonado, expresso em *E. coli* e purificado por cromatografia de afinidade e gel filtração. A purificação resultou em uma proteína pura e um rendimento de 18 % (SOLIMAN et al., 2007). Kim, Lee e Ryu (2008) apresentaram a clonagem do gene de uma esterase termoestável de *Archaeoglobus fulgidus*, uma bactéria hipertermofílica. A esterase foi expressa em *E. coli* e purificada em resina Ni-NTA, porém como o artigo foca na caracterização bioquímica da enzima, os autores não apresentaram dados sobre o rendimento da purificação.

## OBJETIVOS

### *Geral*

Expressar, purificar e caracterizar bioquimicamente uma lipase recombinante de *Staphylococcus xylosus* e uma esterase recombinante de *Lactobacillus plantarum*.

### *Específicos*

Clonar o gene da esterase de *L. plantarum* em pGEM-T Easy;  
Sequenciar o gene da esterase de *L. plantarum*;  
Clonar o gene da esterase de *L. plantarum* em vetor pET14b;  
Expressar a esterase recombinante na forma solúvel;  
Purificar a proteína recombinante por cromatografia de afinidade por metal (níquel);  
Para ambas as enzimas recombinantes:  
Realizar ensaios de especificidade para vários substratos;  
Determinar o efeito da temperatura, pH e íons divalentes na atividade;  
Determinar o efeito de diferentes inibidores sobre a atividade;  
Determinar parâmetros cinéticos;  
Realizar ensaios de dicroísmo circular para iniciar o conhecimento da estrutura tridimensional.





## **CAPÍTULO 2**

### **Expressão heteróloga e purificação de uma lipase termotolerante de *Staphylococcus xylosus***

Fábio Cristiano Angonesi Brod, Márcia Regina Pelisser, Jean  
Borges Bertoldo, Javier Vernal, Carlos Bloch Jr., Hernán Terenzi, Ana  
Carolina Maisonnave Arisi

Artigo publicado em *Molecular Biotechnology* 44 (2), p. 110-119, 2010



## 2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE UMA LIPASE TERMOTOLERANTE DE *Staphylococcus xylosus*

### Resumo

*Staphylococcus xylosus* é um micro-organismo envolvido na fermentação de produtos cárneos e um produtor natural de lipases extracelulares. O objetivo deste estudo foi clonar e expressar em *E. coli* uma lipase de *S. xylosus* (AF208229). O gene da lipase (1084 pb) foi amplificado de uma cepa isolada de salame fermentado naturalmente e introduzido no vetor de expressão pET14b para expressar a proteína fusão recombinante (lipase contendo a cauda de His<sub>6</sub>). A lipase recombinante de *S. xylosus* foi purificada por cromatografia de afinidade em um sistema HPLC. A lipase recombinante é um monômero em solução, como determinado pela cromatografia de exclusão molecular. Ela apresentou alta atividade em pH 9,0 e 42°C para o acetato de *p*-nitrofenila e butirato de *p*-nitrofenila entre vários ésteres testados (pNPC<sub>2</sub>, pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>10</sub>, pNPC<sub>12</sub>, pNPC<sub>14</sub>, pNPC<sub>16</sub>, pNPC<sub>18</sub>). Além disso, apresentou uma interessante estabilidade térmica após incubação por 10 min a 95°C, mantendo 77 % de sua atividade inicial.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus xylosus*, lipase, expressão em *E. coli*

### 2.1. INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos, sendo as enzimas com a mais ampla utilização na biocatálise (SECUNDO et al., 2006). Apesar de amplamente distribuídas em várias espécies, as lipases microbianas possuem um maior potencial industrial e são frequentemente mais úteis que enzimas de outras fontes devido à sua especificidade por substrato, habilidade de permanecer ativa em solventes orgânicos, altos rendimentos e facilidade de manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, lipases bacterianas são as enzimas preferenciais para uma ampla gama de reações devido à sua atividade catalítica em meio aquoso e não aquoso (ROUSTAN et al., 2005). As lipases atuam na interface lipídeo-água e sua atividade catalítica resulta de uma tríade de aminoácidos contendo serina, que por sua vez ocorre na sequência consenso Gly-X-Ser-X-Gly, aspartato ou glutamato e histidina. Análises de estruturas tridimensionais de lipases demonstraram a presença de um típico padrão

de enovelamento tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase (TYNDALL et al., 2002; TIESINGA et al., 2007).

Embora a atividade de uma lipase seja definida como a habilidade de hidrolisar triglicerídeos, as lipases também catalisam outras reações como esterificação e interesterificação. Existe um interesse muito particular na capacidade das lipases catalisarem tais reações e, consequentemente, a síntese de compostos utilizados na manufatura de produtos de alto valor agregado, como lipídeos estruturados livres de estruturas trans (ROUSTAN et al., 2005; ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000; GUPTA; GUPTA;e RATHI, 2004; LUMOR; AKOH, 2008). Cada aplicação requer propriedades únicas referentes à especificidade, estabilidade, temperatura e pH (CHAKRABORTY; RAJ, 2008).

Para hidrólise, esterificação ou outras aplicações de lípases é essencial obter a enzima purificada em altas concentrações e caracterizá-la bioquimicamente. Somente 2% de toda a microbiota conhecida foram testados como fontes de enzimas até 2006 e lipases de diferentes fontes apresentam variações na atividade enzimática, especificidade por ácidos graxos, temperatura e pH ótimos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Mais recentemente, várias novas lipases têm sido caracterizadas (HA et al., 2007; YAO et al., 2008; QUINTANA-CASTRO et al., 2009; JIANG et al., 2005; LUI et al., 2008).

*S. xylosus* é uma bactéria coagulase negativa comumente isolada de produtos cárneos fermentados (MOROT-BIZOT; TALON; LEROY-SETRIN, 2003; IACUMIN et al., 2007; RANTSIOU et al., 2005; SIMONOVÁ et al., 2006; KOZACINSKI et al., 2008). Nestes produtos, *Staphylococci* ssp. são responsáveis pela estabilização da cor, decomposição de peróxidos e formação de aroma através de sua atividade proteolítica e lipolítica (TALON et al., 1999; IACUMIN et al., 2006). Rosenstein e Götz (2000) determinaram a sequência de nove genes de lipases estafilocócicas, incluindo a lipase AF208229 de *S. xylosus*. Todas as lipases estafilocócicas são organizadas de forma semelhante como pré-pró-proteínas com as regiões “pré” correspondendo a um peptídeo sinal de 35-38 aminoácidos, um pró-peptídeo com características hidrofílicas composto de 207-321 aminoácidos e um peptídeo maduro contendo 383-396 resíduos de aminoácidos. Estas lipases são secretadas como pró-proteínas, sendo processadas à forma madura por proteases específicas.

A lipase AF701336 de *S. xylosus* isolada do resíduo de uma indústria de óleo foi purificada e caracterizada (MOSBAH et al., 2005). Rosenstein e Götz (2000) publicaram a sequência do gene *gehM*

correspondente à lipase AF208229 de *S. xylosus* (cepa DSM20266). Contudo, esta lipase nunca foi super-expressa ou caracterizada. A expressão do gene *gehM* foi estudada e sugeriu-se que o aumento no conteúdo de triglicerídeos no meio de crescimento inibe sua expressão (IACUMIN et al., 2007). O objetivo deste estudo foi clonar, expressar, purificar e caracterizar uma lipase de *S. xylosus* isolado de salame naturalmente fermentado.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Cepas, plasmídeos e reagentes

*E. coli* cepa DH5 $\alpha$  foi utilizada como hospedeiro para clonagem do gene e propagação do plasmídeo e a cepa BL21 (DE3) pLysS para expressão da proteína recombinante. O plasmídeo pGEM-T Easy Vector (Promega) foi utilizado para sub-clonagem e sequenciamento do gene, enquanto o pET-14b (Novagen) foi utilizado como vetor de clonagem e expressão. As enzimas de restrição foram obtidas da Promega e a coluna de afinidade HiTrap da GEHealthcare. Os ésteres de *p*-nitrofenila e o isopropil-L-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG) foram obtidos da Sigma. A cepa de *S. xylosus* foi isolada de salame naturalmente fermentado (FIORENTINI et al., 2009).

### 2.2.2 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da lipase

Um fragmento codificador da lipase madura AF208229 de *S. xylosus* foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores LIP1 (5'-GCTGCAAAACAAGGACAGTATAA-3') e LIP2 (5'-TAAGCATCAAATTGCTCGTTACGA-3'). As amplificações foram realizadas em um volume final de 25  $\mu$ L contendo 1x PCR Buffer (20 mM Tris-HCl; pH 8,4; 50 mM KCl) 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 mM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em Minicycler<sup>TM</sup> (MJ Research Inc., Watertown, MA) com o seguinte programa: desnaturação a 95°C por 5 min; seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1,5 min; uma extensão final a 72°C por 7 min.

O produto da PCR foi então re-amplificado com os iniciadores LIPET1 (5'-TTCTCGAGCAAGGACAGTATAAAACC-3') e PIPET2 (5'-TTACGGATCCTCAG TAGGATGATT-3'). O fragmento resultante foi então purificado com o kit Concert Rapid PCR (Gibco BRL) e ligado ao pGEM-T Easy Vector (Promega). Este plasmídeo, *pGEM\_lip2*, foi usado na transformação das cepas *E. coli* DH5 $\alpha$ .

A análise das sequências de DNA foi realizada em um equipamento MegaBace1000 (Amersham Biosciences) no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A ferramenta BLAST foi utilizada para pesquisa das bases de dados. A comparação entre o gene clonado e o gene da lipase AF208229 foi realizado no software ClustalX 2.0.9.

### 2.2.3 Construção do vetor de expressão pET14b\_lip

O fragmento de DNA obtido da digestão do plasmídeo *pGEM\_lip2* com *XhoI/SalI* foi ligado em fase no vetor pET14b previamente digerido com *XhoI* e defosforilado. A inserção do gene foi confirmada pela análise de restrição com a enzima *EcoRI*. O plasmídeo recombinante foi nomeado *pET14b\_lip*. A proteína expressa carrega uma cauda His<sub>6</sub> na porção N-terminal, codificada pelo vetor de expressão.

### 2.2.4 Expressão e purificação da lipase

*pET14b\_lip* foi utilizado para transformar cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Células contendo o plasmídeo recombinante foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo LB suplementado com 100 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de cloranfenicol e incubados *overnight* a 37°C. Estas culturas foram transferidas para 250 mL do mesmo meio e mantidas a 37°C até DO<sub>600</sub> atingir 0,8. A seguir, adicionou-se IPTG a uma concentração final de 1 mM e diferentes condições de temperatura (30 e 37°C) e tempo de indução (5 e 18 h) foram testadas. Após a indução as células foram coletadas por centrifugação (3000x g, 15 min, 4°C) e o pellet foi lavado uma vez com 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0. As células foram ressuspensas em tampão A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) suplementado com 40 µg/ml de PMSF e rompidas em sonicador (7 ciclos, 20s, em gelo). As células rompidas foram separadas por centrifugação (10000x g, 20 min, 4°C) para obtenção do extrato celular solúvel. Este extrato, contendo a lipase recombinante, foi injetado em uma coluna HiTrap (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão A e conectada a um sistema HPLC ÄKTA (GE Healthcare). A lipase recombinante foi eluída em um gradiente de imidazol variando de 60 a 500 mM e frações de 1 mL foram coletadas. A lipase purificada foi submetida à diálise (2 vezes) de 24 h contra 1 L de 50 mM de tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> contendo 300 mM de NaCl e pH 8,0. Pureza e massa molecular aparente foram determinados por eletroforese em gel de

poliacrilamida em condições desnaturantes. O SDS-PAGE foi realizado com géis contendo 10 % (p/v) de poliacrilamida de acordo com protocolo padrão e utilizando o equipamento Mini-PROTEAN da Bio-Rad. Os géis foram corados com Azul de Coomassie R-250 e descorados com metanol/ácido acético/água (5/1/4 v/v/v). Concentração proteica foi determinada com o kit Bio-Rad Protein Assay e BSA como padrão. Experimentos adicionais de impressão digital de peptídeos por LC/MS da lipase digerida por tripsina foram realizados utilizando um UFLC Prominence (Shimadzu Co.) acoplado a um HCT Ultra ETD II (Bruker Daltonics) espectrômetro de massas *ion trap*.

### **2.2.5 Determinação do estado oligomérico da lipase recombinante por gel-filtração**

O estado oligomérico da lipase recombinante em solução foi estimado em triplicata por gel filtração em uma coluna Superdex 200 Prep Grade (GE Healthcare) conectada a um sistema HPLC ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 8,0 contendo 300 mM de NaCl e calibrada com BSA, 66 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; citocromo C, 12,4 kDa e aprotinina, 6,5 kDa. A proteína foi eluída no mesmo tampão.

### **2.2.6 Hidrólise de triglicerídeos**

A habilidade de hidrolisar triglicerídeos foi testada em um ensaio qualitativo em placas de Petri. Meio LB foi suplementado com 2 % ágar e óleo de oliva autoclavado 2,5 %. Após a esterilização, rodamina B foi adicionada para uma concentração final de 0,1 mg/mL e misturada completamente antes de adicionar a mistura em placas. A seguir, 100  $\mu\text{L}$  do extrato celular solúvel foram aplicados nas placas e incubados a 37°C por 24 h. A hidrólise de triglicerídeos foi identificada pela fluorescência sob luz UV 350 nm.

### **2.2.7 Atividade enzimática da lipase**

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com Winkler e Stuckmann (1978) com as modificações de Maia et al. (2001) utilizando butirato de *p*-nitrofenila (pNPC<sub>4</sub>) como substrato. A produção do *p*-nitrofenol foi continuamente monitorada a 410 nm em um espectrofotômetro de microplacas (TECAN Infinite Series M200) por 60 min em um volume final de 300  $\mu\text{L}$ . Para a reação, uma solução estoque de 8 mM de pNPC<sub>4</sub> foi preparada em isopropanol e misturado com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 para uma concentração final de 1 mM de pNPC<sub>4</sub>.

Em seguida, 270  $\mu\text{L}$  da solução contendo substrato foram adicionados em 30  $\mu\text{L}$  de solução enzimática. Absortividade molar do *p*-nitrofenol foi determinada experimentalmente como  $18015,43 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de *p*-nitrofenol por min

### 2.2.8 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase

O efeito do pH foi determinado pela medição da atividade enzimática em diferentes valores de pH (7,0; 8,0 e 9,0). Os tampões utilizados para os testes de pH foram PIPES (50 mM, pH 7,0), Tris-HCl (50mM, pH 8,0) e CHES (50 mM, pH 9,0). As reações foram realizadas adicionando-se ao tampão a quantidade necessária da solução estoque de substrato para obter 1 mM de pNPC<sub>4</sub>. A reação foi iniciada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  da solução enzimática em 270  $\mu\text{L}$  da solução contendo substrato. Para investigar o efeito da temperatura, as reações foram realizadas a 25, 37 e 42°C em um espectrofotômetro de microplacas (TECAN Infinite Series M200) como descrito anteriormente. A absortividade molar do *p*-nitrofenol foi determinada experimentalmente para cada pH como  $9554,33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (pH 7,0),  $18015,43 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (pH 8,0) e  $18669,31 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (pH 9,0).

### 2.2.9 Especificidade por substrato

Especificidade por substrato foi determinada utilizando ésteres de *p*-nitrofenol (pNPC<sub>2</sub>, pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>10</sub>, pNPC<sub>12</sub>, pNPC<sub>14</sub>, pNPC<sub>16</sub>, pNPC<sub>18</sub>) como substrato. Uma solução estoque (8 mM) de cada éster foi preparada em isopropanol. Os substratos foram emulsionados a uma concentração final de 1 mM em tampão CHES 50 mM pH 9,0 contendo 1,1 mg/mL de goma arábica e 4,4 mg/mL de Triton X-100 (WOODY, 1995). A mistura de reação consistiu de 270  $\mu\text{L}$  do substrato emulsionado e 30  $\mu\text{L}$  da solução contendo a enzima. As reações foram realizadas em um espectrofotômetro de microplacas (TECAN Infinite Series M200) como descrito anteriormente.

### 2.2.10 Parâmetros cinéticos

A atividade enzimática da lipase foi determinada em função de diferentes concentrações de pNPC<sub>4</sub> (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 e 2 mM). A constante de afinidade por substrato de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e o número de *turnover* ( $k_{cat}$ ) foram calculados pelo software GraphPad Prism 5.01. A eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) também foi determinada.



### 2.2.11 Ensaio de termoestabilidade

O ensaio para testar a termoestabilidade da lipase recombinante foi realizado pela incubação da solução da enzima a 95°C em banho termostatzado. Alíquotas foram coletadas após 10, 20 e 30 min e as medições da atividade enzimática foram realizadas a 42°C e pH 9,0 utilizando butirato de *p*-nitrofenila como substrato.

### 2.2.12 Espectroscopia de dicroísmo circular

Amostras da proteína foram concentradas a 11 µM em tampão 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 contendo 20 mM de NaCl e escaneadas a 20°C usando uma cubeta de 5 mm de caminho óptico. O espectro de dicroísmo circular foi obtido em um espectropolarímetro JASCO J-815 equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier. O espectro representa a média de 5 leituras em uma faixa de comprimentos de onda variando de 195 a 260 nm com uma velocidade de escaneamento de 50 nm/min e uma resolução de 0,1 nm. O conteúdo de α-hélice da proteína foi avaliado usando a equação de Woddy (1995):

$$\% \alpha \text{ hélice} = \frac{(-[\theta]_{222\text{nm}} + 3000)}{39000}$$

## 2.3 RESULTADOS

O DNA genômico extraído de uma cepa de *S. xylosus* isolada de salame fermentado naturalmente (FIORENTINI et al., 2009) foi utilizado como molde na reação de PCR e o fragmento flanqueado pelos iniciadores LIP1/LIP2 foi amplificado visando à obtenção da sequência correspondente à lipase madura. Este fragmento foi então re-amplificado com os iniciadores LIPET1/LIPET2 para a inserção do sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Xho*I. O fragmento correspondente à região madura da lipase de *S. xylosus* foi clonado no vetor pGEM-T Easy e nomeado *pGEM\_lip2*. Este foi propagado em *E. coli* DH5-α e utilizado para o sequenciamento. A análise da sequência revelou uma sequência de nucleotídeos de 1084 pb com uma homologia de 99 % com a lipase AF208229 de *S. xylosus*. A sequência deduzida de aminoácidos, correspondente à proteína madura, apresentou 361 aminoácidos, uma massa molecular teórica de 40,47 kDa e a seguinte identidade com outras lipases estafilocócicas: 80 % para a lipase de *S. hominis* SK119 (EEK11887.1), 78 % para a lipase de *S. warnery* (AB189474.1) e 78 % para a lipase de *S. epidermidis* (AAA19729).

### 2.3.1 Expressão e purificação da lipase recombinante de *S. xylosus*

Para clonar o fragmento correspondente à região madura da lipase no vetor pET14b, o plasmídeo *pGEM\_lip2* foi digerido com as enzimas *XhoI* e *Sall* e o fragmento resultante foi inserido no vetor pET14b. A inserção do fragmento foi confirmada pela digestão com *EcoRI* e sequenciamento. O fragmento foi inserido em fase com a sequência codificadora da seguinte sequência de aminoácidos: MGGSHHHHHSSGLVPAGSH MLEQGQYKNQD, onde o Q24 corresponde ao Q1 da lipase madura. A sequência codificadora correspondente a dois aminoácidos, Asp e Pro, foi adicionada ao final 3' do fragmento como um artefato de clonagem. O plasmídeo recombinante foi nomeado *pET14b\_lip*.

*E. coli* BL21 (DE3) pLysS foi transformada com o plasmídeo *pET14b\_lip* para expressar a lipase recombinante com a cauda His<sub>6</sub>. Diferentes períodos de indução (5 e 18 h) e temperaturas (30 e 37°C) foram testados para a expressão da lipase recombinante. Foi observado que a melhor condição foi 5 h de indução a 30°C após a adição de 1 mM de IPTG no meio de crescimento, o que foi confirmado por uma banda extra de aproximadamente 42 kDa no SDS-PAGE (Figura 10). A lipase recombinante foi então purificada do extrato celular solúvel por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap conectada a um sistema ÄKTA utilizando um gradiente de imidazol variando de 60 a 500 mM. A proteína fusão ligada à resina foi eluída em um volume total de 4 mL quando a concentração de imidazol atingiu 150 mM (Figura 10). Uma vez que o imidazol interfere no ensaio de atividade por espectrofotometria quando da utilização de ésteres de *p*-nitrofenol, ele foi removido por diálise contra tampão fosfato como descrito em “Material e Métodos”. O rendimento da expressão foi de 26,7 mg/L de cultivo celular.

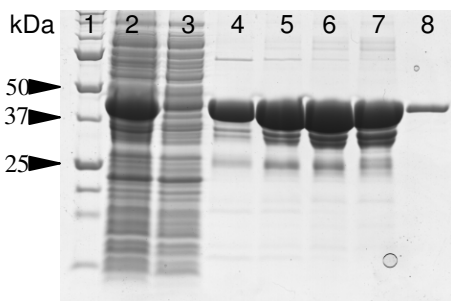


Figura 10: SDS-PAGE da purificação da lipase de *S. xylosus* em coluna HiTrap. Canaleta 1: marcador molecular; canaleta 2: proteínas solúveis totais da *E. coli* BL21(DE3) pLysS expressando a lipase de *S. xylosus* a 30°C após 5 h de indução; canaleta 3: lavagem com imidazol 60 mM; canaletas 4-7: eluatos da lipase contendo 70,8, 71,4, 189,3 e 144,3 µg de proteína, respectivamente. Canaleta 8: lipase após a gel filtração (2,07 µg). 15 µL por canaleta.

### 2.3.2 Determinação estado oligomérico da lipase recombinante

No SDS-PAGE da lipase recombinante, uma banda de aproximadamente 42 kDa foi observada (Figura 10). A mobilidade eletroforética da lipase foi consistente com peso molecular teórico (42,9 kDa) predito para a proteína recombinante completa. A identidade da lipase foi confirmada por espectrometria de massas (Figura 11 e Tabela 1). A impressão digital dos peptídeos da lipase recombinante digerida com tripsina apresentou 16 peptídeos que representaram a cobertura de 145 dos 384 resíduos da proteína intacta.

MGGSHHHHHSSGLVPAGSHMLEQGQYKNQDPHILVHGF  
 NGFTDDINPAVLAHYWGGDKLNIRQDLESNGYETYEASV  
 GALGSNYDRAVELYYYIKGGTVDYGAHAHAKEYGHERY  
 KTYEGVYKDWQPGKKVHLVAHSMGGQTVRQLEELLRN  
 GNQEELGYQKEHGGEISPLFQGNNDNMVNSIATIGTPHNG  
 THAADALGNEAIVRQLAFDYAKFKGNKNSKVDGFGQW  
 GLKQREGETYAPYVHRVQNSGLWKTEDNGFYDLAREGA  
 AKLNKNTSLNPNIVYKTYTGESTRPTLFGNQKSDVNLFPL  
 FTVTGNVIGKAAEKWRENDGLVSTISSQHPFNQAFIEAT  
 DEVKKGVWQVTPIKHGWDHVDVFGQDSTDSIHPT

Figura 11: Sequência de aminoácidos da lipase recombinante de *S. xylosus*. Os peptídeos identificados por LC/MS estão sublinhados e em caixas cinza. Espectrometria de massa foi realizada em um UFLC Prominence acoplado a um *ion trap* HCT Ultra ETD II.

Tabela 1: Detecção de peptídeos da lipase recombinante de *S. xylosus* após digestão triptica por LC/MS.

Peptídeo	Posição	Massa (Da)
LNIR	60-63	515,33
AVELYYYIK	80-96	1161,62
GGTVDYGAHAEEK	97-109	1275,59
YGHER	110-114	661,30
TYEGVYK	118-124	859,42
DWQPGK	125-130	730,35
VHLVAHSMGGQTVR	132-145	1491,78
QLEELLR	146-152	900,51
NGNQEEIEYQK	153-163	1351,30
QLAFDYAK	208-215	955,49
VDFGFGQWGLK	224-234	1253,63
VQNSGLWK	248-255	931,50
TEDNGFYDLTR	256-266	1330,30
NTSLNPNIVYK	275-285	1262,67
EWK	324-326	490,24
GVWQVTPIK	355-363	1027,59

O estado oligomérico da lipase recombinante em seu estado nativo foi determinado pela comparação de seu perfil de eluição com o de vários marcadores moleculares em uma coluna de gel filtração (Figura 12). A lipase eluiu em um volume de 84,16 mL, entre os volumes de eluição da anidrase carbônica (29 kDa) e da BSA (66 kDa). A partir da correlação linear entre o volume de eluição e o log da massa molecular, a lipase recombinante em estado nativo pode ser considerada um monômero de aproximadamente 42,6 kDa.

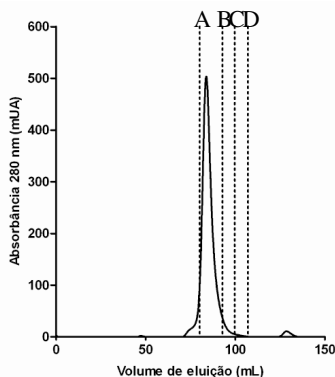


Figura 12: Cromatografia por gel filtração da lipase de *S. xylosus* em coluna Superdex 200 Prep Grade. Linhas verticais pontilhadas (A-D) representam os marcadores moleculares da calibração da coluna. (A) BSA (66 kDa, 80,21 mL); (B) anidrase carbônica (29 kDa, 92,91 mL); (C) citocromo C (12,4 kDa, 99,68 mL) e (D) aprotinina (6,5 kDa, 107,09 mL). O volume de eluição da lipase recombinante de *S. xylosus* foi 84,19 mL.

### 2.3.3 Atividade da lipase

Em relação à hidrólise do azeite de oliva no ensaio qualitativo com rodamina B, observou-se que os extratos celulares de cepas de *E. coli* contendo a lipase recombinante apresentaram a habilidade de clivar este substrato, confirmado pela presença de fluorescência quando os extratos foram aplicados (Anexo A).

A atividade específica da lipase recombinante foi determinada pelo monitoramento da produção de *p*-nitrofenol a partir da hidrólise de pNPC<sub>4</sub> a 410 nm. A lipase purificada apresentou atividade específica de 1,47 U/mg a 25°C e pH 8,0.

### 2.3.4 Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase

Três valores de pH (7,0, 8,0 e 9,0) e três temperaturas (25, 37 e 42°C) foram testados com pNPC<sub>4</sub> como substrato para determinar a

influência do pH e temperatura na atividade da lipase recombinante da *S. xylosus* (Figura 13).

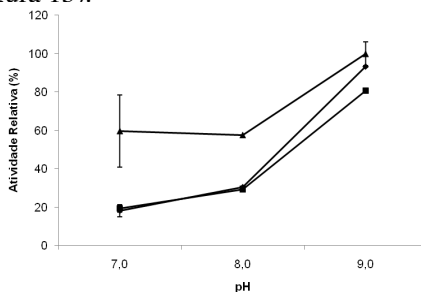


Figura 13: Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase recombinante de *S. xylosus*. O ensaio de atividade foi realizado com 1 mM butirato de *p*-nitrofenila como substrato no tampão apropriado (50 mM) a diferentes pHs e temperaturas 25°C (círculos), 37°C (quadrados) e 42°C (triângulos). A atividade foi medida em um espectrofotômetro de microplacas. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade medida em pH 9,0 e 42°C.

A enzima é ativa na faixa de pH variando de 7,0 a 9,0 com atividade mais alta em pH 9,0 (4,83 U/mg), sendo drasticamente reduzida para 0,88 U/mg em pH 7,0. Com relação à temperatura, a lipase de *S. xylosus* apresentou a atividade mais elevada a 42°C (Figura 13). Além disso, a enzima apresentou uma importante estabilidade térmica. A enzima recombinante foi incubada a 95°C por 10, 20 e 30 min. Após o tratamento térmico, a atividade da lipase foi medida a 42°C em pH 9,0, sendo que ela manteve 77% de sua atividade inicial (Figura 14).

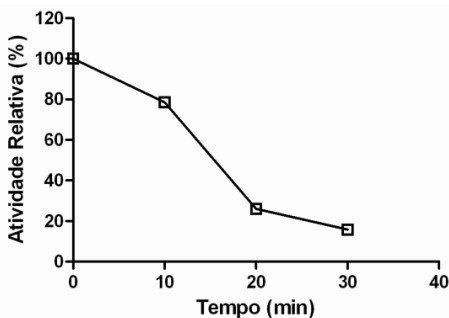


Figura 14: Termoeestabilidade da lipase recombinante de *S. xylosus* a 95°C. A enzima foi incubada a 95°C por 10, 20 e 30 minutos. Após o tratamento térmico, a atividade enzimática foi medida a 42°C e pH 9,0 utilizando o butirato de *p*-nitrofenila como substrato. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade da lipase.

### 2.3.5 Especificidade por substrato

A especificidade por substrato foi avaliada pela determinação da atividade enzimática em vários ésteres de *p*-nitrofenol com diferentes comprimentos da cadeia lateral (pNPC<sub>2</sub>, pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>10</sub>, pNPC<sub>12</sub>, pNPC<sub>14</sub>, pNPC<sub>16</sub>, pNPC<sub>18</sub>) em pH 9,0 e a 42°C (Figura 15). A lipase recombinante apresentou atividade mais elevada para o pNPC<sub>2</sub> (10,15 U/mg), seguido pelo pNPC<sub>4</sub> (4,83 U/mg). A atividade mais baixa resultou do pNPC<sub>18</sub> (0,313 U/mg).

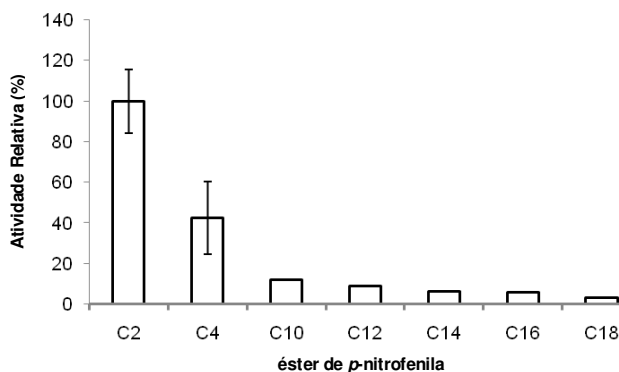


Figura 15: Atividade relativa da lipase recombinante de *S. xylosus* para ésteres de *p*-nitrofenila de diferentes comprimentos de cadeia, pH 9,0 e 42°C. A hidrólise foi determinada para acetato de *p*-nitrofenila (C2), butirato de *p*-nitrofenila (C4), decanoato de *p*-nitrofenila (C10), laurato de *p*-nitrofenila (C12), miristato de *p*-nitrofenila (C14), palmitato de *p*-nitrofenila (C16) e estearato de *p*-nitrofenila (C18). Resultados estão expressos como percentagem da atividade da lipase medida com C2 como substrato.

### 2.3.6 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos da lipase recombinante foram determinados pela medição da taxa de hidrólise de diferentes concentrações de pNPC<sub>4</sub>. Os dados foram plotados (Figura 16) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ), constante de afinidade ( $K_m$ ), número de turnover ( $k_{cat}$ ) e a eficiência catalítica ( $K_m/k_{cat}$ ) foram determinados (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da lipase recombinante de *S. xylosus* com pNPC<sub>4</sub>

Atividade específica (U/mg)	$V_{max}$ (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
7.06	10.93	0.507	0.0078	0.0154

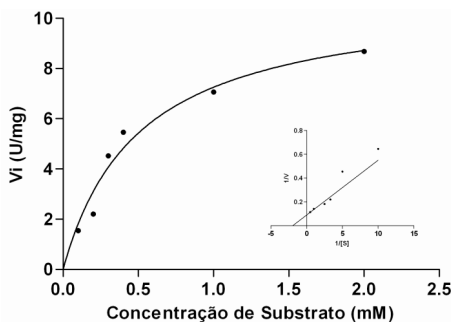


Figura 16: Gráfico da cinética de Michaelis-Menten da lipase recombinante de *S. xylosus* determinado pela liberação de *p*-nitrofenol de várias concentrações de pNPC<sub>4</sub>. O gráfico *inset* mostra o duplo recíproco de Lineweaver-Burk dos dados transformados. Os ensaios foram realizados em tampão CHES 50 mM pH 9,0 a 42°C utilizando pNPC<sub>4</sub> como substrato.

### 2.3.7 Espectroscopia de dicroísmo circular

A lipase recombinante de *S. xylosus* possui um perfil típico de  $\alpha$ -hélice, com o espectro de UV distante mostrando picos mínimos a 208 e 222 nm (Figura 17). A Análise do espectro (KELLY; PRICE, 2000) sugere que a quantidade de estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélices representam um total de 49,65%, o que é esperado para um membro da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases, como previamente descrito (OLLIS et al., 1992; TIESINGA et al., 2007).

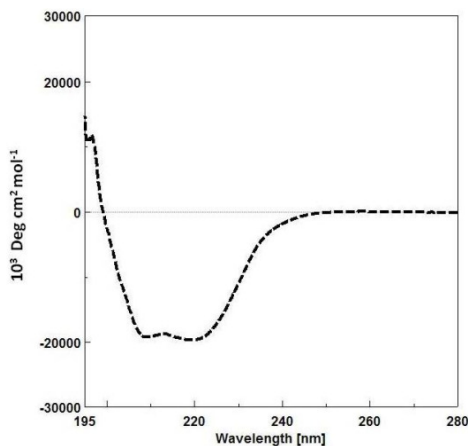


Figura 17: Espectro CD da lipase recombinante de *S. xylosus* a 20°C. Picos mínimos em 208 nm e 222 nm indicam um perfil típico de  $\alpha$ -hélice.

## 2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o fragmento correspondente à região madura do gene da lipase de uma cepa de *S. xylosus* isolada de salame fermentado naturalmente foi clonado, sequenciado e expresso em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Ela apresentou uma homologia de 99 % com a lipase AF208229 (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000), sendo que esta enzima nunca foi caracterizada. Mosbah et al. (2005) clonaram e expressaram a lipase AF701336 de uma cepa de *S. xylosus* isolada do resíduo de uma indústria de óleos que apresenta a sequência completa Gly-X-Ser-X-Gly. A sequência de aminoácidos da lipase AF208229 apresenta 53 % de identidade com a lipase AF701336. A lipase recombinante purificada é um monômero, como foi determinado por cromatografia de exclusão molecular. A lipase AF701336 de *S. xylosus* também é uma proteína monomérica (MOSBAH et al., 2005). Diferentemente de outras lipases estafilocócicas previamente descritas e que apresentaram propriedades de formação de agregados em condições nativas, estas duas lipases de *S. xylosus* permaneceram como monômeros em solução.

Lipases são enzimas versáteis que possuem atividade de síntese e hidrólise além de apresentar outras atividades relacionadas a esterases e exibir ampla especificidade por substratos (SVENDSEN, 2000). Geralmente, lipases estafilocócicas apresentam suas atividades mais elevadas quando em pH alcalino, com algumas exceções como a SAL-1 de *S. aureus* e a SEL-3 de *S. epidermidis* (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000). A SAL-3 de *S. aureus*, recentemente caracterizada, apresentou atividade ótima em pH 9,5 e 55°C (HORCHANI et al., 2009). Além disso, a lipase AF701336 de *S. xylosus* apresentou atividade ótima em pH 8,2 e 45°C (MOSBAH et al., 2005). A lipase recombinante de *S. xylosus* apresentada neste trabalho parece ter preferências similares por valores de pH e temperatura elevados, 9,0 e 42°C, respectivamente. Além disso, ela apresentou uma expressiva tolerância térmica quando exposta a altas temperaturas. Após 10, 20 e 30 min a 95°C, a enzima reteve 77, 24 e 14 % de sua atividade inicial, respectivamente. Informações sobre a termoestabilidade de lipases estafilocócicas são escassas até o presente, sendo os únicos exemplos a lipase de *S. xylosus* (MOSBAH et al., 2005) que manteve 50 % de sua atividade após 15 min a 60°C e a lipase de *S. saprophyticus* (SAKINÇ; KLEINE; GATERMANN, 2007) que manteve 80 % de sua atividade após 15 min a 60°C e 30 % após 15 min sob fervura. Ainda, uma lipase de *S. simulans* foi inativada após alguns minutos a 60°C (SAYARI et al., 2001). De fato, enzimas termoestáveis possuem várias aplicações devido à sua estabilidade inerente (DEMIRIJAN; MORIS-VARAS; CASSIDY,



2001; HAKI; RAKSHIT, 2003), embora aplicações para lipases estafilocócicas termoestáveis não tenham sido reportadas. Uma vantagem importante da condução de processos biotecnológicos a elevadas temperaturas é a redução do risco de contaminação por bactérias mesófilas (PALMA-FERNANDES; GOMES; SILVA, 2002). Além disso, temperaturas elevadas permitem ainda altas taxas de reação devido à diminuição da viscosidade e um aumento no coeficiente de difusão dos substratos e um alto rendimento do processo devido ao aumento na solubilidade dos substratos e produtos (HAKI; RAKSHIT, 2003). Assim, a habilidade das lipases em permanecer estável em altas temperaturas é uma característica importante para aplicações biotecnológicas.

Algumas lipases estafilocócicas, como a SEL-3 da *S. epidermidis*, SHaL de *S. haemolyticus*, SAL1 de *S. aureus*, SWL2 de *S. warneri* hidrolizam preferencialmente substratos aquo-solúveis de cadeia curta (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000; SAKINÇ; KLEINE; GATERMANN, 2007; VAN KAMPEN et al., 2001), enquanto SHyL de *S. hyicus* e SXL de *S. xylosus* (AF701336) (MOSBAH et al., 2005) não apresentam especificidade para comprimento de cadeia para a hidrólise de triacilgliceróis. A lipase de *S. saprophyticus* apresentou o mesmo perfil da lipase recombinante purificada neste trabalho para especificidade por comprimento de cadeia, com preferência por pNPC<sub>2</sub> seguido por pNPC<sub>4</sub> (SAKINÇ; KLEINE; GATERMANN, 2007) apesar de apresentar diferentes temperaturas (30°C) e pH (6,0).

Considerando os parâmetros cinéticos, o baixo valor de  $K_m$  (0,5 mM) observado para a lipase recombinante mostra que esta enzima apresenta alta afinidade pelo substrato com quatro carbonos na cadeia lateral. Uma lipase de *S. saprophyticus* apresentou um valor de  $K_m$  de 1,47 mM para o mesmo substrato (SAKINÇ; KLEINE; GATERMANN, 2007) e uma lipase recombinante de *S. epidermidis* apresentou 0,9 mM (CHANG; CHOU; SHAW, 2000). O valor de  $k_{cat}$  apresentado pela lipase recombinante de *S. xylosus* (0,0078 s<sup>-1</sup>) foi mais baixo que da lipase recombinante de *S. epidermidis* (25,1 s<sup>-1</sup>) (CHANG; CHOU; SHAW, 2000), assim como a eficiência catalítica (0,0154 e 28,2 s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, respectivamente).

O padrão de enovelamento  $\alpha/\beta$ -hidrolase é caracterizado por 5 a 8 fitas conectadas por  $\alpha$ -hélices que formam o denominado sanduíche  $\alpha/\beta/\alpha$ . Na maioria dos membros desta família, as folhas  $\beta$  são paralelas (HOTELIER, 2008). A lipase recombinante de *S. xylosus* apresentada neste trabalho apresenta um conteúdo de  $\alpha$ -hélices de aproximadamente

47%, compatível com o conteúdo de estrutura secundária da estrutura tridimensional determinada para a lipase de *S. hyicus* (TIESINGA et al., 2007), que apresenta 3 folhas  $\beta$  paralelas e 12  $\alpha$ -hélices. Os membros desta superfamília divergiram de um ancestral comum em um número de enzimas hidrolíticas com uma ampla gama de especificidades por substrato, juntamente com outras proteínas sem atividade catalítica reconhecida (HOTELIER, 2008). Comparando com a estrutura da lipase de *S. hyicus*, a tríade catalítica da lipase recombinante de *S. xylosus* apresenta-se em *loops*, um dos quais, o “cotovelo nucleofílico”, é a característica mais conservada deste padrão de enovelamento que ocorre na maioria dos membros da família (HOTELIER, 2008).

Ésteres de ácidos graxos de cadeia curta são conhecidos como componentes de *sabor/aroma* amplamente empregados na indústria de alimentos, bebidas, cosmética e farmacêutica (MACEDO; LOZANO; PASTORE, 2003). Há um aumento na preferência por produtos “naturais” em detrimento a sabores/aromas sintetizados quimicamente (LARIOS et al., 2004) principalmente devido ao fato de a catálise química utilizar ácidos e poluentes como catalisadores (SALAH, 2007) levando a produtos escurecidos e sub-produtos indesejáveis (CHANG; CHOU; SHAW, 2001). Além disso, ésteres utilizados como sabores/aromas produzidos por síntese enzimática podem ser rotulados como produtos “naturais”. Várias publicações sobre a produção destes compostos por lipases estão disponíveis (CHEN, 1996; SHAW, 2000; SVENDSEN, 2000; DEMIRIJAN; MORIS-VARAS; CASSIDY, 2001; SAYARI et al., 2001; VAN KAMPEN et al., 2001; PALMA-FERNANDES; GOMES; SILVA, 2002; HAKI; RAKSHIT, 2003; LIU; HOLLAND; CROW, 2003; CHANG; CHOU; LARIOS, 2004; SAKINÇ; KLEINE; GATERMANN, 2007; SALAH, 2007; HOTELIER, 2008; HORCHANI et al., 2009;), incluindo lipases de *S. warnei*, *S. xylosus* (TALON; MONTEL; BERDAGUE, 1996) e *S. epidermidis* (CHANG; CHOU; SHAW, 2001). Assim, a lipase recombinante de *S. xylosus* apresentada neste trabalho poderá ser útil na produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta como o acetato de isoamila.

## 2.5 CONCLUSÃO

O gene codificador de uma lipase de *S. xylosus* foi clonado e expresso com sucesso. A sequência amplificada apresentou uma similaridade de 99% com a lipase AF208229 da cepa *S. xylosus* DSM 20266. Este é o primeiro artigo a mostrar a purificação, caracterização

bioquímica e biofísica da lipase AF208229. Ela apresentou alta atividade específica em pH 9,0 e 42°C para o pNPC<sub>2</sub> e pNPC<sub>4</sub>. Além disso, apresentou alta termo tolerância quando submetida a 95°C por 10 min. Uma caracterização bioquímica e estrutural mais aprofundada é necessária para o completo entendimento desta enzima e seu mecanismo de reação, o que será objeto de próximas publicações.

## 2.6 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado pelo CNPq processos 476285/2007-0 e 552508/2007-1, e Rede Proteoma de Santa Catarina (FAPESC/FINEP/MCT). FCAB foi bolsista CAPES, Ministério da Educação, Brasil. JBB foi bolsista CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil.



### **CAPÍTULO 3**

#### **Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização de uma Nova Esterase de *Lactobacillus plantarum***

Fábio Cristiano Angonesi Brod, Javier Vernal, Jean Borges Bertoldo,  
Hernán Terenzi, Ana Carolina Maisonnave Arisi

Artigo publicado em *Molecular Biotechnology* 44 (3), p. 242-249, 2010.



### 3. CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA ESTERASE DE *Lactobacillus plantarum*

#### Resumo

*Lactobacillus plantarum* é uma importante bactéria ácido láctica, geralmente encontrada como microbiota natural de alguns alimentos como vegetais e produtos cárneos fermentados. Contudo, pouca informação tem sido reportada a respeito de bactérias ácido-láticas como fonte de enzimas úteis, especialmente *L. plantarum*. O objetivo deste estudo foi clonar, expressar em *E. coli*, purificar e caracterizar uma esterase de *L. plantarum* ATCC 8014. O gene da esterase (1014 pb) foi amplificado e clonado no vetor de expressão pET14b para expressar em *E. coli* a proteína contendo a cauda His<sub>6</sub>. A esterase recombinante de *L. plantarum* foi purificada em resina Ni-NTA e apresentou uma massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa. A enzima apresentou a atividade enzimática mais elevada em pH 6,0 e 40°C e preferência pelo butirato de *p*-nitrofenila, embora tenha hidrolisado mais eficientemente o acetato de *p*-nitrofenila. Além disso, este estudo apresenta, pela primeira vez, dados de dicroísmo circular sobre a estrutura secundária de uma esterase de *L. plantarum*.

**Palavras chave:** *L. plantarum*, esterase, expressão em *E. coli*, caracterização bioquímica, dicroísmo circular.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

As esterases pertencem ao grupo das hidrolases éster carboxílicas (E.C. 3.1.1) e as lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise e a síntese de acilgliceróis de cadeia longa. Esterases, por sua vez, catalisam a hidrólise de glicerolesteres de cadeia curta (CHOI et al., 2004). Apesar de amplamente distribuídas em inúmeras espécies, esterases e lipases microbianas apresentam alto potencial industrial e são frequentemente mais úteis que enzimas provenientes de outras fontes devido ao alto rendimento e facilidade de manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED et al., 2006).

Esterases apresentam o padrão de enovelamento característico de  $\alpha/\beta$ -hidrolases e apresentam a sequência consenso Gly-X-Ser-X-Gly flanqueando o resíduo ativo de Ser, que por sua vez faz parte da tríade catalítica contendo, ainda, um resíduo de Asp ou Glu e um resíduo de

His (BORNSCHEUER, 2002). O pentapeptídeo está, geralmente, localizado entre uma folha  $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice, formando uma volta acentuada denominada “cotovelo nucleofílico” (CHOI et al., 2004).

Embora vários artigos descrevendo a clonagem e expressão de esterases e lipases microbianas tenham sido publicados (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000; LOPES et al., 2002, RHEE et al., 2005; YAO et al., 2008; SOLIMAN et al., 2007; QUINTANA-CASTRO et al., 2009; BROD et al., 2010), pouca informação tem sido reportada a respeito de bactérias ácido-láticas como fonte de enzimas. Apesar do fato de o papel dos *Lactobacilli* na produção de alimentos fermentados ser bem documentado e estudado, pouca informação está disponível a respeito das esterases de *Lactobacillus* spp., provavelmente como consequência da baixa produção destas enzimas por estes micro-organismos, principalmente quando comparados com *Staphylococcus* spp. (LOPES et al., 2002). *L. plantarum* possui uma longa história de ocorrência natural e segura em uma ampla variedade de alimentos fermentados, estando envolvido no desenvolvimento do *sabor/aroma* e aroma deste tipo de produto. Além disso, a capacidade lipolítica de uma cepa de *L. plantarum* foi demonstrada por Lopes et al., (1999) e duas lipases foram purificadas de cultivos de *L. plantarum* (LOPES et al., 2002; GOBBETTI et al., 1996). O objetivo deste estudo foi clonar, expressar, purificar e caracterizar uma nova esterase de *L. plantarum*.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Cepas, plasmídeos, meios e reagentes

*E. coli* cepa DH5 $\alpha$  foi utilizada como hospedeiro para clonagem do gene e propagação do plasmídeo e a cepa BL21 (DE3) pLysS para expressão da proteína recombinante. O vetor pGEM-T Easy Vector (Promega) foi utilizado para sub-clonagem, enquanto o pET-14b (Novagen) foi utilizado como vetor de clonagem e expressão. As enzimas BamHI e HindIII foram obtidas da Promega e a resina Ni-NTA da QIAGEN. Os ésteres de *p*-nitrofenila, isopropil-L-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), pirocarbonato de dietila (DEPC), óxido de fenilarsina (PAO) e hidrato de fenilglioxal (PGO) foram obtidos da Sigma. A cepa *L. plantarum* ATCC 8014 foi obtida da Coleção Fundação André Tosello.

### 3.2.2 Construção do pGEM-Est\_Lpl

O gene da lipase/esterase de *L. plantarum* foi amplificado com os iniciadores LipLPF (5'-GGA TCC GAT GCC AAC AAT TAA TTC G-



3') e LipLPR (5'-GGA TCC CTA AAT TAA CGC GGC CGC-3'), contendo o sítio de restrição para *Bam*HI (sublinhado). Estes iniciadores foram desenhados a partir da sequência do gene putativo da lipase/esterase já publicado (KLEEREBEZEM et al, 2003) (número de acesso do GenBank lp\_0973; número de acesso do GenBank ao genoma completo de *L. plantarum* AL935263). As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 1x PCR Buffer (20 mM Tris-HCl; pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polymerase e 2 µl de DNA. As amplificações foram realizadas em Minicycler™ (MJ Research Inc., Watertown, MA) com o seguinte programa: desnaturação a 95°C por 5 min; seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min e 72°C por 1,5 min; extensão final a 72°C por 7 min. O fragmento de DNA obtido (1014 bp) foi extraído do gel, purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e ligado ao pGEM-T Easy Vector (Promega). O plasmídeo recombinante pGEM-Est\_Lpl foi utilizado para a transformação de cepas competentes de *E. coli* DH5α. Os transformantes positivos foram analisados por análise de restrição com *Bam*HI e aqueles apresentando o gene da esterase foram propagados em *E. coli* DH5α e utilizados para a construção do vetor de expressão.

### 3.2.3 Construção do vetor de expressão pET14b-Est\_Lpl

Os fragmentos de DNA obtidos da digestão do pGEM-Est\_Lpl com *Bam*HI foram ligados ao vetor pET14b previamente digerido com a mesma enzima e defosforilado. A inserção do gene foi confirmada através da análise de restrição com *Hind*III e sequenciamento. O plasmídeo recombinante foi denominado *pET14b-Est\_Lpl*. A proteína expressa carrega uma cauda N-terminal de His<sub>6</sub> codificada pelo vetor de expressão. O número de acesso do GenBank para a sequência da esterase recombinante descrita neste estudo é GQ497844.

### 3.2.4 Expressão e purificação da esterase recombinante

Células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o vetor *pET14b-Est\_Lpl* foram inoculadas em 10 mL de caldo LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de cloranfenicol. Cultivos *overnight* foram transferidos para 250 mL do mesmo meio e cultivados a 37°C até a DO<sub>600nm</sub> atingir 0,8. A seguir, adicionou-se IPTG (concentração final de 1 mM) e as seguintes condições foram testadas para expressão: 15, 30 e 37°C por 5 e 18 h. Após a indução as células

foram coletadas por centrifugação (3000 x g, 15 min, 4°C) e o pellet foi lavado uma vez com 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0. As células foram ressuspensoes em tampão A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) suplementado com 40 µg/mL de PMSF e rompidas em sonicador (7 ciclos, 20s, em gelo). As células rompidas foram separadas por centrifugação (10000 x g, 20 min, 4°C) para obtenção do extrato celular solúvel. Este extrato, contendo a esterase recombinante, foi purificado em condições nativas com a resina Ni-NTA previamente equilibrada com tampão A de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). A proteína recombinante foi eluída com 250 mM de imidazol e dialisada duas vezes contra 1 L de tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0 contendo 300 mM NaCl.

A pureza e massa molecular aparente foram determinados por SDS-PAGE, que foi realizado com géis contendo 10 % (p/v) de poliacrilamida de acordo com protocolo padrão e utilizando o equipamento Mini-PROTEAN da Bio-Rad. Os géis foram corados com Azul de Coomassie R-250 e descorados com metanol/ácido acético/água (5/1/4 v/v/v). A concentração proteica foi determinada com o kit Bio-Rad Protein Assay e BSA como padrão.

### 3.2.5 Ensaio de Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro (HITACHI U2910) a 348 nm através do monitoramento da liberação de *p*-nitrofenol a partir do butirato de *p*-nitrofenila (pNPC<sub>4</sub>) por 5 min a 40°C (RHEE et al., 2005). Para realizar a reação, uma solução estoque de pNPC<sub>4</sub> a 100 mM foi preparada em *isopropanol* e adicionada em quantidade suficiente de tampão fosfato 50 mM pH 6,0 para obter uma solução com concentração final de 1 mM. A reação foi, então, iniciada pela adição de 1 µg de proteína. O branco (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, 300 mM NaCl, pH 8,0) foi sempre executado em paralelo. O coeficiente de extinção molar para o *p*-nitrofenol foi determinado experimentalmente como 5487,25 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Uma unidade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto.

### 3.2.6 Efeito do pH e temperatura na atividade da esterase

O efeito do pH foi avaliado pela determinação da atividade enzimática em uma faixa de pH variando de 5,0 a 9,0. Os tampões utilizados foram acetato de sódio 50 mM (pH 5,0 e 5,5), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0, 6,5 e 7,0), Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), e CHES 50 mM

(pH 9,0). As reações foram realizadas adicionando uma quantidade suficiente da solução estoque de 100 mM de pNPC<sub>4</sub> ao tampão apropriado, obtendo uma solução com concentração final de 1 mM. A reação foi, então, iniciada pela adição de 1 µg de proteína. Para investigar o efeito da temperatura, reações foram realizadas a várias temperaturas em pH 6,0: 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C. O coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol foi determinado experimentalmente para todos os pHs testados: 5487,25 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (pH 5,0, 5,5 e 6,0), 6010,23 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (pH 6,5), 9554,33 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (pH 7,0), 18015,43 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (pH 8,0) e 18669,31 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (pH 9,0).

### 3.2.7 Especificidade por substrato

A especificidade por substrato foi determinada utilizando ésteres de *p*-nitrofenila (acetato (pNPC<sub>2</sub>), butirato (pNPC<sub>4</sub>), caprilato (pNPC<sub>8</sub>), caprato (pNPC<sub>10</sub>), laurato (pNPC<sub>12</sub>), miristato (pNPC<sub>14</sub>) e palmitato (pNPC<sub>16</sub>)) como substrato de acordo com de acordo com Winkler e Stuckmann (1978) com as modificações de Maia et al. (2001). Uma solução estoque de cada éster de *p*-nitrofenila foi preparada em *isopropanol*. Os substratos foram emulsificados para uma concentração final de 1 mM em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 contendo goma arábica (1,1 mg/mL) e Triton X-100 (4,4 mg/mL). A mistura de reação consistiu de 998 µL de substrato emulsificado e 2 µL de solução contendo a enzima (1 µg). As reações foram realizadas a 40°C em espectrofotômetro (HITACHI U2910) como descrito anteriormente.

### 3.2.8 Parâmetros cinéticos

A atividade enzimática da esterase foi determinada em função de diferentes concentrações de pNPC<sub>2</sub> e pNPC<sub>4</sub> (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 e 3 mM). A constante de afinidade por substrato de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e o número de *turnover* ( $k_{cat}$ ) foram calculados pelo software GraphPad Prism 5.01. A eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) também foi determinada.

### 3.2.9 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade da esterase

O efeito de modificadores de serina (PMSF), histidina (DEPC), arginina (PGO) e cisteína (PAO), assim como o efeito de vários íons metálicos (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub>), EDTA, DMSO e etanol foram determinados de acordo com Rhee et al. (2005) com algumas modificações. Um micrograma de proteína foi incubado em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 contendo 1 mM de cada

reagente modificador, metal ou 1 % de DMSO ou etanol em temperatura ambiente (25°C) por 10 min. A atividade residual foi medida a 25°C como descrito anteriormente.

### 3.2.10 Espectroscopia de dicroísmo circular

Previamente ao ensaio de dicroísmo circular, a proteína foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 Prep Grade (GE Healthcare) conectada em um sistema ÄKTA de purificação (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 8,0 contendo 300 mM de NaCl. O espectro de dicroísmo circular foi medido a 40°C em um espectropolarímetro JASCO J-815. O espectro de UV-distante (representado como uma média de 5 leituras) da esterase recombinante de *L. plantarum* foi medido em uma faixa de comprimentos de onda variando de 195 a 260 nm, com uma velocidade de escaneamento de 100 nm/min e uma resolução de 0,1 nm. Todas as determinações foram realizadas em uma cubeta de 0,1 cm de caminho óptico e usando uma concentração proteica de 4,5  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato de sódio pH 6,0. Todos os espectros foram subtraídos do espectro do tampão.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Clonagem e análise da sequência da esterase

O DNA genômico extraído do *L. plantarum* ATCC 8014 (SAWITZKI et al., 2007) foi amplificado com os iniciadores LipLPF e LipLPR e um fragmento de aproximadamente 1014 pb foi obtido. Uma vez que este fragmento consiste do gene putativo completo da lipase/esterase de *L. plantarum* cepa WCFS1 (KLEEREBEZEM et al., 2003), ele foi clonado diretamente no vetor pGEM-T Easy. O plasmídeo recombinante obtido (pGEM-Est\_Lpl) foi propagado em *E. coli* DH5 $\alpha$  e sequenciado. Após a confirmação da sequência do gene, o pGEM-Est\_Lpl foi digerido com *Bam*HI e o fragmento de DNA obtido foi ligado no vetor pET14b, resultando no plasmídeo recombinante *pET14b-Est\_Lpl*. A presença do inserto no plasmídeo recombinante foi verificada pela digestão deste com *Hind*III e a identidade e orientação do gene foram determinadas através do sequenciamento, que mostrou que o gene da esterase foi inserido em fase com a seguinte sequência codificadora da cauda His<sub>6</sub>: MGSSHHHHHHSSGLVPAGSHMLG.

A sequência deduzida de aminoácidos da proteína recombinante apresentou 337 resíduos com massa molecular teórica de 39,075 kDa (para a proteína contendo a cauda His<sub>6</sub>) e uma identidade de 100 % com

a lipase/esterase putativa do *L. plantarum* WCFS1 (NP\_784685.1). Além disso, ambas as sequências (GQ497844 da cepa ATCC 8014 e NP\_784685.1 da cepa WCFS1) apresentaram uma identidade de nucleotídeos de 99 %. A sequência de aminoácidos da esterase de *L. plantarum* apresentou duas regiões comumente associadas com esterases e lipases: o pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly, cobrindo os resíduos 172–176, que por sua vez contém a provável serina ativa (Ser174) e o bolsão do oxiânion, cobrindo os resíduos 105–108 (Figura 18). A sequência deduzida de aminoácidos foi utilizada para realizar uma busca na base de dados BLAST, sendo que a similaridade mais alta encontrada foi com a esterase de *L. plantarum*, seguida de outras esterases/lipases incluindo uma esterase/lipase (YP\_796253.1) de *L. brevis* ATCC 367 (57%), uma esterase/lipase (EEI39690.1) de *Gordonia bronchialis* DSM 43247 (50%), uma lipase (ZP\_03666814.1) de *Listeria monocytogenes* Finland 1988 (45%), uma proteína contendo o domínio  $\alpha/\beta$ -hidrolase (YP\_001135818.1) de *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK (45%) e uma acetil esterase (YP\_001879185.1) de *Shigella boydii* CDC 3083-94 (42%). O alinhamento com esterases de estrutura terciária conhecida (pdb 1JJI, pdb 2C7B e pdb 1EQV, Figura 18) sugere que os resíduos Ser174, Asp283 e His313 podem ser a tríade catalítica uma vez que estes resíduos são altamente conservados em lipases e esterases (CHOI, MIGUEZ e LEE, 2004; SVENDSEN, 2000).

### 3.3.2 Expressão e purificação da esterase recombinante

O plasmídeo recombinante *pET14b-Est\_Lpl* foi transformado em cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para expressar a esterase recombinante contendo a cauda His<sub>6</sub>. Diferentes tempos de indução (5 e 18 h) e temperaturas (15, 30 e 37°C) foram avaliados para a expressão. A esterase recombinante foi expressa após 18 h a 15°C e purificada a partir do lisado de células por cromatografia de afinidade com metal imobilizado em resina de níquel-nitriloacetato. A proteína foi eluída com 250 mM de imidazol e migrou, em SDS-PAGE, como uma única banda com massa molecular aparente de aproximadamente 38 kDa (Figura 19). Tal mobilidade eletroforética foi consistente com a massa molecular teórica calculada para a proteína recombinante completa (39,07 kDa). O rendimento da expressão foi de 2,15 mg/L de cultivo celular.

**A**

Est_Lpl	95	VIN-HTVLV <b>YF</b> HGGAFY <b>G</b>
NP_784685.1	95	VIN-HTVLV <b>YF</b> HGGAFY <b>G</b>
EEI39690.1	77	ESSSG-LLI <b>YF</b> HGGGFVL
YP_796253.1	110	MLNADKAYI <b>YF</b> HGGAYY <b>G</b>
ZP_03666814.1	109	EDGFFEII <b>YV</b> HGGGFVL
YP_001135818.1	71	DAIDASVV <b>YF</b> HGGGMVM
YP_001879185.1	81	-PDSPATLF <b>YF</b> HGGGFIL
pdb 1JJJI	77	-PDS-PVL <b>YV</b> HGGGFVI
pdb 2C7B	70	KAAGLPAVL <b>YV</b> HGGGFVF
pdb 1EVQ	69	VEPPYPALV <b>YV</b> HGGGWVV

**B**

Est_Lpl	166	-MITVA <b>GDSAG</b> ANVI
NP_784685.1	166	-MITVA <b>GDSAG</b> ANVI
EEI39690.1	153	ERIVVA <b>GDSAG</b> GNLA
YP_796253.1	181	--ISLG <b>GDSAG</b> ASIA
ZP_03666814.1	187	SDIIVA <b>GDSAG</b> GNLA
YP_001135818.1	148	ARLAVA <b>GDSAG</b> GSLA
YP_001879185.1	157	SRIGFA <b>GDSAG</b> AMLA
pdb 1JJJI	152	SKIFVG <b>GDSAG</b> GNLA
pdb 2C7B	146	DRIAVA <b>GDSAG</b> GNLA
pdb 1EVQ	147	ARIAVG <b>GDSAG</b> GNLA

**C**

Est_Lpl	244	IMTDYYVFN-FDSHSPLISPLHQENFTMTPTT <b>IMVGEF</b> PF	FRPQAWAYAQR	LAADTATTT <b>IQYQGLN</b> HA
NP_784685.1	244	IMTDYYVFN-FDSHSPLISPLHQENFTMTPTT <b>IMVGEF</b> PF	FRPQAWAYAQR	LAADTATTT <b>IQYQGLN</b> HA
EEI39690.1	216	FTDNYTDESV-RTDPRVSPLLADDL <b>SGLP</b> PAHVLVAG <b>FD</b> PL	RDEGLAYAQRL	ADAGVAVTVQ <b>RESSML</b> HA
YP_796253.1	258	IMSGYYVADQVDLTAPLL <b>SPL</b> ADPTTFHN-VLLVGE <b>YD</b> PF	RLQGEAFV	KVRKGHANGD <b>TNYFRYGGIS</b> HA
ZP_03666814.1	256	KFFKLYIANASDRKYDPLVAP <b>IR</b> SKDLVGLPKT <b>FIATAEF</b> DL	RQGEAYAKKL	KDAGVEVF <b>AKRFEKVP</b> HA
YP_001135818.1	212	YMH <del>E</del> LAD <b>DGVGA</b> -PHDAYRIPAY <b>AEDLSGL</b> PPAIVVTG <b>EC</b> DL	RDWGERYAQR	LDRVQ <b>TTLTRYPGMY</b> HA
YP_001879185.1	223	YMEEAYLSNDAD-RESPY <b>YCLF</b> NNDLTREVP <b>PCFI</b> AGAE <b>FD</b> PL	LLDSRLLYQTL	AAHQ <b>QCEFKLYPGTL</b> HY
pdb 1JJJI	216	SWFSEQYFSREEDKFNPLAS-VIFADLENLPPAL <b>II</b> TA <b>EY</b> DL	RDEGEVFG	QMLRRAGVEAS <b>IVRYRGVL</b> HA
pdb 2C7B	212	VMFGRQYLKRPEEAYDFKAS-PLLADL <b>GGLPP</b> ALVVTA <b>EY</b> DL	RDEGELYAYKK	ASGSRAVAV <b>RFAGXV</b> HA
pdb 1EVQ	212	LWFRDQYLSLEELTHPWFSPVLYPDL <b>SGLP</b> PAYIATA <b>QY</b> DL	RDVGKLYAEAL	NKAGVKVE <b>IENTFEDL</b> HA

Figura 18: Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da esterase de *L. plantarum* (Est\_Lpl) com outras proteínas mostrando (A) cavidade do oxiânion, (B) pentapeptídeo contendo a serina ativa e (C) resíduos de aspartato e histidina que formam o provável sítio ativo. (▼) Provável tríade catalítica. Est\_Lpl esterase de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; NP\_784685.1 lipase/esterase de *Lactobacillus plantarum* WCFS1; EEI39690.1 esterase/lipase de *Gordonia bronchialis* DSM 43247; YP\_796253.1 esterase/lipase de *Lactobacillus brevis* ATCC 367; ZP\_03666814.1 lipase de *Listeria monocytogenes* Finland 1988; YP\_001135818.1 proteína contendo domínio de alpha/beta hidrolase de *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK; YP\_001879185.1 acetil esterase de *Shigella boydii* CDC 3083-94; pdb|1JJJI carboxilesterase de *Archaeoglobus fulgidus*; pdb|2C7B de Uncultured archaeon estE1 carboxilesterase; pdb|1EVQ carboxilesterase de *Alicyclobacillus acidocaldarius*. O alinhamento completo pode ser visualizado no Anexo B.

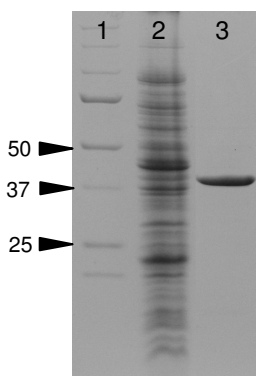


Figura 19: SDS-PAGE da purificação por resina de Ni-NTA da esterase recombinante de *L. plantarum*. *Canaleta 1* marcador de peso molecular, *canaleta 2* proteínas solúveis totais da *E. coli* BL21(DE3) pLysS após 18 h de indução a 15°C, *canaleta 3* esterase purificada.

### 3.3.3 Atividade Enzimática

O imidazol remanescente, um interferente para o ensaio de atividade, foi retirado da solução contendo a enzima purificada por diálise. A atividade enzimática da esterase foi determinada espectrofotometricamente a 348 nm por 5 min utilizando pNPC<sub>4</sub> como substrato. A esterase purificada apresentou uma atividade específica de  $17,2 \pm 3,12$  U/mg.

### 3.3.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade da esterase

Vários valores de pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 e 9,0) e temperaturas (25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 e 60 °C) foram testados para determinar o efeito do pH e da temperatura na atividade da esterase recombinante. Como apresentado na Figura 20a, esta esterase é mais ativa em pH 5,0 a 7,0. A atividade relativa aumentou de 50,3 % até o máximo (100 %) em pH 6,0 e então diminuiu para 43,9 % em pH 8,0, seguida de uma drástica redução em pH 9,0, mantendo apenas 2,6 % de sua atividade total. Em relação à temperatura, a esterase recombinante apresentou atividade mais alta (100 %) a 40°C (Figura 20b) e altas atividades em temperaturas na faixa de 30 a 50°C com atividades relativas de 73,3 % e 78 %, respectivamente.

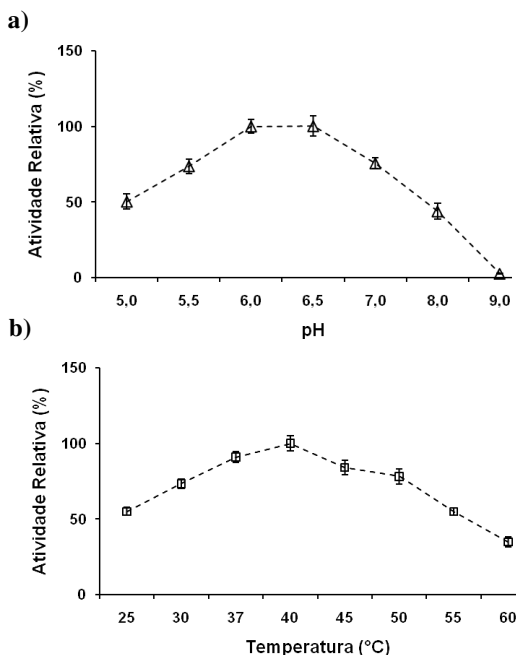


Figura 20: Efeito do pH (a) e temperatura (b) na atividade da esterase recombinante de *L. plantarum*. Para avaliar o efeito do pH, a atividade enzimática foi medida com pNPC<sub>4</sub> utilizando diferentes tampões: acetato de sódio 50 mM (pHs 5,0 e 5,5), fosfato de sódio 50 mM (pHs 6,0; 6,5 e 7,0) Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) e CHES 50 mM (pH 9,0). Para avaliar o efeito da temperatura, a atividade enzimática foi medida com pNPC<sub>4</sub> em pH 6,0. Resultados estão expressos como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes.

Este comportamento é consistente com as descrições de outras esterases de *Lactobacilli*. Uma esterase intracelular de *L. casei* LILA (FENSTER; PERKIN; STEELE, 2003) apresentou atividade mais alta em pH 5,5 – 6,0 e 30°C. Uma lipase (GOBBETTI et al., 1996) e uma tributirinaesterase (GOBBETTI; FOX; STEPANIAK, 1997) de *L. plantarum* 2739 apresentaram as atividades mais elevadas em pH 7,5 e 7,0, respectivamente, e a 35°C. Por outro lado, uma arilesterase de *L. helveticus* CNRZ32 apresentou pH ótimo de 8,0 em temperaturas variando de 35 a 40°C (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000). Uma esterase clonada e purificada de uma biblioteca metagenômica (RHEE et



al., 2005) apresentou atividade mais elevada em pH 6,0 e manteve mais de 80 % de sua atividade na faixa de pH entre 5,5 e 7,5. O pH ótimo de 6,0 observado para a presente esterase recombinante é esperado, uma vez que *L. plantarum* é uma bactéria ácido láctica.

### 3.3.5 Especificidade por substrato

A especificidade por substrato foi determinada pela avaliação da atividade enzimática com ésteres de *p*-nitrofenila com diferentes comprimentos de cadeia lateral (pNPC<sub>2</sub>, pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>8</sub>, pNPC<sub>10</sub>, pNPC<sub>12</sub>, pNPC<sub>14</sub>, pNPC<sub>16</sub>) em pH 6,0 e 40°C. A esterase recombinante apresentou a atividade mais elevada para o pNPC<sub>2</sub> (128,9 U/mg), seguida do pNPC<sub>4</sub> (15,7 U/mg). Nenhuma atividade foi detectada para os outros ésteres de *p*-nitrofenila nas condições testadas. Especificidade similar foi encontrada em uma esterase de *Xanthomonas oryzae* (KANG et al., 2008), que hidrolisou apenas pNPC<sub>2</sub> e pNPC<sub>4</sub>, com atividade mais alta para pNPC<sub>2</sub>. Uma arilesterase de *L. plantarum* (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000) apresentou altas atividades para pNPC<sub>4</sub>, pNPC<sub>2</sub> e pNPC<sub>12</sub>. Uma esterase de *L. casei* CL96 (CHOI; MIGUEZ; LEE, 2004) hidrolisou pNPC<sub>2</sub> até pNPC<sub>12</sub>, com atividade mais alta neste último. Este perfil de hidrólise de substratos é característico de uma esterase, que é uma enzima mais comumente ativa em ácidos graxos de cadeia curta, isto é, substratos solúveis em água.

### 3.3.6 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados por ensaio espectrofotométrico utilizando pNPC<sub>2</sub> e pNPC<sub>4</sub> como substratos. A esterase recombinante apresentou cinética hiperbólica de Michaelis-Menten (Figura 21) para os dois substratos.  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$  foram calculados e são apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que a esterase é mais seletiva para o pNPC<sub>4</sub>, apresentando um  $K_m$  de 0,1185, apesar de apresentar um  $V_{max}$  mais baixo para este substrato. Contudo, os valores de  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$  mostram que esta esterase recombinante hidrolisa mais eficientemente o pNPC<sub>2</sub> do que o pNPC<sub>4</sub>.

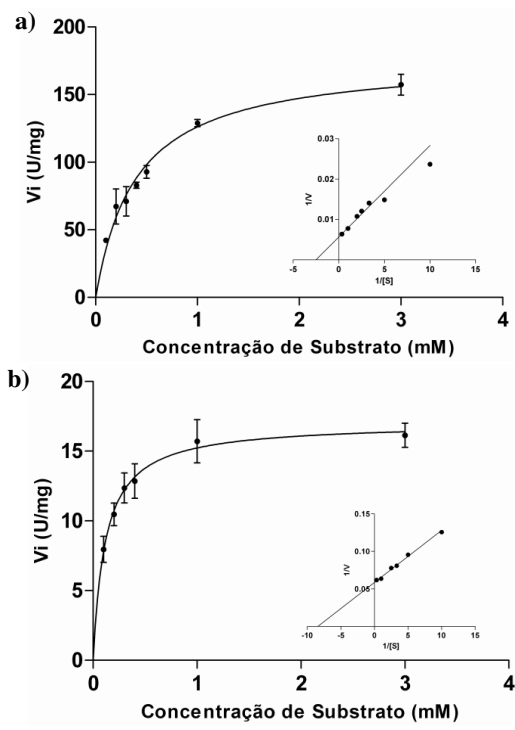


Figura 21: Gráficos de Michaelis-Menten da esterase recombinante de *L. plantarum*. A cinética foi medida espectrofotometricamente utilizando (a) pNPC<sub>2</sub> e (b) pNPC<sub>4</sub> como substratos. Os gráficos *inset* mostram o duplo recíproco de Lineweaver-Burk dos dados transformados. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 a 40 °C.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos da esterase recombinante de *L. plantarum*.

Substrato	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
pNPC <sub>2</sub>	$176,7 \pm 7,7$	$0,401 \pm 0,100$	$114,9 \pm 5,0$	$286,4 \pm 12,5$
pNPC <sub>4</sub>	$17,0 \pm 1,1$	$0,119 \pm 0,032$	$11,1 \pm 0,7$	$93,5 \pm 6,1$

As atividades enzimáticas foram determinadas a 40 °C em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0). Os resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes.

### 3.3.7 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade da esterase

A esterase recombinante foi incubada por 10 min. em temperatura ambiente na presença de vários íons metálicos e inibidores antes de ter sua atividade residual determinada (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito de íons metálicos, modificadores de aminoácidos, etanol e DMSO na atividade da esterase recombinante de *L. plantarum*.

Tratamento	Atividade relativa (%)
Controle	100 ± 11,6
AlCl <sub>3</sub>	123,9 ± 13,7
CaCl <sub>2</sub>	98,3 ± 7,9
MgCl <sub>2</sub>	101,2 ± 8,5
MnCl <sub>2</sub>	106,1 ± 8,4
ZnSO <sub>4</sub>	112,7 ± 14,7
EDTA	105,2 ± 6,6
DEPC	23,8 ± 11,8
PAO	105,4 ± 5,1
PGO	105,9 ± 9,2
PMSF	90,4 ± 6,5
Etanol (1 %)	84,0 ± 5,6
DMSO (1 %)	88,6 ± 7,8

As atividades residuais foram determinadas espectrofotometricamente utilizando pNPC<sub>4</sub> como substrato a 25 °C em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) e íons metálicos, modificadores de aminoácidos a 1mM. A enzima (1 µg) foi incubada por 10 min em cada tratamento antes das leituras. Resultados estão expressos como média ± DP de três experimentos independentes. DEPC (pirocarbonato de dietila) PAO (óxido de fenilarsina), PGO (hidrato de fenilglioxal), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), DMSO (dimetil sulfóxido).

De modo geral, os íons metálicos não produziram efeito significativo na atividade da esterase, nem mesmo o Ca<sup>2+</sup>, que é conhecido por estabilizar enzimas lipolíticas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Porém, a presença de Al<sup>3+</sup> produziu um pequeno aumento na atividade enzimática. Observou-se ainda que EDTA não exerceu influência detectável na atividade da enzima, sugerindo que a esterase recombinante pode não ser uma metaloenzima. A

tributirinaesterase purificada de *L. plantarum* (GOBBETTI; FOX; STEPANIAK, 1997) foi moderadamente estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , enquanto uma lipase purificada de *L. plantarum* (GOBBETTI et al., 1996) não foi afetada por 1 mM destes dois íons. Além disso, ambas as enzimas foram negativamente influenciadas por 1 mM de EDTA. Com relação aos modificadores de aminoácidos, a esterase foi fortemente inibida (23,8 % de atividade residual) pelo pirocarbonato de dietila (DEPC), um modificador de histidina, e levemente inibida (90,4 % de atividade residual) pelo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), um modificador de serina, sugerindo a dependência da enzima no modelo clássico da tríade catalítica composta por Ser-Asp/Glu-His. Estudos sugeriram que o único resíduo de Cisteína de uma arilesterase de *L. helveticus* (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000) e de uma esterase de *L. casei* (CHOI; MIGUEZ; LEE, 2004) era importante para a atividade destas enzimas. Contudo, a atividade enzimática da presente esterase recombinante não foi afetada pelo modificador de Cisteína (PAO), parecendo que o único resíduo deste aminoácido (Cys130) não participa do mecanismo de hidrólise. Além disso, o modificador de arginina (PGO) não influenciou na atividade da esterase. A tributirinaesterase de *L. plantarum* (GOBBETTI; FOX; STEPANIAK, 1997) foi fortemente afetada pelo PMSF, enquanto a lipase de *L. plantarum* (BOBBETTI et al., 1996) foi levemente afetada. Além disso, esterases de *L. helveticus* CNRZ32 (FENSTER; PARKIN; STEELE, 2000), *L. casei* LILA (FENSTER; PERKIN; STEELE, 2003), *L. casei* CL96 (CHOI; MIGUEZ; LEE, 2004) e de uma biblioteca metagenômica (RHEE et al., 2005) foram igualmente afetadas por PMSF e as últimas duas fortemente afetadas por DEPC.

A esterase recombinante de *L. plantarum* apresentou estabilidade ao DMSO e etanol, mantendo mais de 80 % da atividade total. A estabilidade na presença de solventes orgânicos é uma característica importante e valiosa para aplicações biotecnológicas (SOLIMAN et al., 2007).

### 3.3.8 Espectroscopia de dicroísmo circular

A estrutura secundária da esterase recombinante foi investigada através de medidas de dicroísmo circular. O espectro de UV distante apresentou um pico mínimo em 218 nm (Figura 22), indicando a predominância de folhas  $\beta$  antiparalelas, diferente de outras esterases que apresentaram estruturas desordenadas (MULLER-SANTOS et al., 2009) e  $\alpha$ -hélices (FOGLIA et al., 2007).

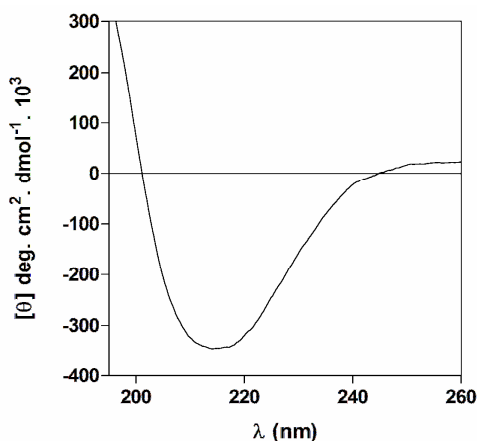


Figura 22: Espectro do dicroísmo circular da esterase recombinante de *L. plantarum* em pH 6,0 e 40°C. O pico em 218 nm indica um perfil típico de folhas  $\beta$  antiparalelas.

A análise do espectro (WHITMORE; WALLACE, 2004) mostrou a presença de 38,6 % de folhas  $\beta$  e 23,4 % de  $\alpha$ -hélices. A presença deste conteúdo misto de hélices e folhas resolvido pelo algoritmo CDSSTR (WHITMORE; WALLACE, 2004) indica que esta esterase pode ser incluída no grupo de enovelamento  $\alpha/\beta$ , uma vez que esterases são primeiramente caracterizadas por este tipo de enovelamento, predominantemente folhas  $\beta$  antiparalelas flanqueadas por  $\alpha$ -hélices (NARDINI; DIJKSTRA, 1999).

### 3.4. CONCLUSÕES

O gene codificador de uma esterase de *L. plantarum* foi clonado e expresso com sucesso. A sequência deduzida de aminoácidos obtida apresentou 100 % de similaridade com a lipase/esterase de *L. plantarum* WCFS1. Esta é a primeira publicação a mostrar a clonagem, expressão e purificação de uma esterase de *L. plantarum*. Além disso, a caracterização bioquímica e biofísica foi realizada. A proteína recombinante apresentou atividade específica mais elevada em pH 6,0 e 40°C para o acetato de *p*-nitrofenila, seguido do butirato de *p*-nitrofenila. A esterase foi fortemente influenciada por DEPC e, mais levemente, por PMSF, sugerindo que a atividade catalítica depende de resíduos de serina e histidina.

### 3.5 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado pelo CNPq processos 476285/2007-0 e 552508/2007-1, e Rede Proteoma de Santa Catarina (FAPESC/FINEP/MCT). FCAB foi bolsista CAPES, Ministério da Educação, Brasil. JBB foi bolsista CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes de uma lipase de *Staphylococcus xylosus* e de uma esterase de *Lactobacillus plantarum* foram clonados e as enzimas expressas em *E. coli*, purificadas por cromatografia de afinidade e caracterizadas bioquimicamente com sucesso.

Para a lipase de *S. xylosus*, dados cinéticos, efeitos de pH, temperatura, especificidade por substrato e dados sobre sua estrutura secundária foram apresentados. Os resultados obtidos neste trabalho parecem sugerir que a lipase de *S. xylosus* é, na verdade, uma esterase, pois apresentou especificidade por substratos hidrossolúveis. Contudo, o gene codificador desta enzima teve sua sequência publicada no ano de 2000 e, desde então, esta vem sendo designada como uma lipase estafilocócica, principalmente devido a sua sequência de aminoácidos possuir maior identidade com lipases do que com esterases. Além disso, outros substratos devem ser testados para confirmar sua especificidade.

Para a esterase de *L. plantarum*, dados cinéticos, efeitos de pH, temperatura, especificidade por substrato, efeitos de íons metálicos, modificadores de aminoácidos e solventes orgânicos foram apresentados. Além disso, dados iniciais sobre a estrutura secundária desta esterase foram obtidos através de espectroscopia de dicroísmo circular.

Uma caracterização bioquímica e estrutural mais aprofundada é necessária para um entendimento completo destas enzimas e seus mecanismos de reação, o que será objeto de próximas publicações.





## REFERÊNCIAS

- ARNAU, J., LAURITZEN, C., PETERSEN, G. E., PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, 48, 1-13, 2006
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, 26, 73-81, 2002.
- BRADDOO, S., SAXENA, R. K., GUPTA, R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 15, 97-102, 1999.
- BROD, F. C. A., PELISSER, M. R., BERTOLDO, J. B., VERNAL, J., BLOCH JR, C., TERENCE, H., ARISI, A. C. M., Heterologous expression and purification of a heat-tolerant *Staphylococcus xylosus* lipase. **Molecular Biotechnology**, 44, 110-119, 2010.
- BUYEN, J-S., RHEE, J-K., KIM, N. D., YOON, J., KIM, D-U., KOH, E., OH, J-W., CHO, H-S. The crystal structure of EstE1, a new thermophilic and thermostable carboxylesterase clone from a metagenomic library. **BMC Structural Biology**, 7, 47, 2007.
- BYUNG-CHUL, O., KIM, H. K., KIM, M. H., LEE, J. K., OH, T. K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase; high level expression in *Escherichia coli* and activation of nonionic detergent. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 10 (5), 656-662, 2000.
- CARSON, M., JOHNSON, D. H., McDONALD, H., BROUILLETTE, C., DELUCAS, L. J. His-tag impact on structure. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 63, 295-301, 2007.
- CHAKRABORTY, K., RAJ, R. P. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, 109, 727-736, 2008.

CHANG, R. C., CHOU, S. J., SHAW, J. F. Site-directed mutagenesis of a highly active *Staphylococcus epidermidis* lipase fragment identifies residues essential for catalysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 77, 1021–1025, 2000.

CHANG, R. C., CHOU, S. J., SHAW, J. F. Synthesis of fatty esters by recombinant *Staphylococcus epidermidis* lipases in aqueous environment. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 2619–2622, 2001.

CHEN, J. P. Production of ethyl butyrate using gel entrapped *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 82(4), 404–407, 1996.

CHOI, Y.J., MIGUEZ, C.M., LEE, B.H. Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 3213–3221, 2004.

CÔTÉ, A., SHAREK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, 42, 381–388, 2008.

DHARMSTHITI, S., LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, 179, 241–246, 1999.

DEMIRIJAN, D., MORIS-VARAS, F., CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biology**, 5, 144–151, 2001.

DEREWENDA, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, 34, 354–363, 2004.

DE SIMONE, G., MENCHISE, V., MANCO, G., MANDRICH, L., SORRENTINO, N., LANG, D., ROSSI, M., PEDONE, C. The crystal structure of a hyper-thermophilic carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **Journal of Molecular Biology** 314, 507–518, 2001.

DE VRIES, M. C., VAUGHAN, E. E., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal** 16 (9), 1018-1028, 2006.

DHARMSTHITI, S., PRATUANGDEJKUL, J., THEERAGOO, G., LUCHAI, S. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **Journal of Genetics Applied Microbiology**, 44, 139-145, 1998.

FENSTER, K. M., PERKIN, K. L., STEELE, J. L. Intracellular Esterase from *Lactobacillus casei* LILA: Nucleotide Sequencing, Purification and Characterization. **Journal of Dairy Science**, 86, 1118-1129, 2003.

FENSTER, K.M., PARKIN, K.L., STEELE, J.L. Characterization of an arylesterase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 572-583, 2000.

FIorentini, A. M., SAWITZKI, M. C., BERTOL, T. M., BROD, F. C. A., PELISSER, M. R., ARISI, A. C. M., SANT'ANNA, E. S. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 737–746, 2009.

FOGLIA, F., MANDRICH, L., PEZZULLO, M., GRAZIANO, G., BARONE, G., ROSSI, M., MANCO, G., DEL VECCHIO, P. Role of N-terminal region for the conformational stability of esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Biophysical Chemistry**, 127, 113-122, 2007.

GHAMGUI, H., KARRA-CHAÂMBOUNI, M., BEZZINI, S., MILED, N., GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, 38, 788-794, 2006.

GOBBETTI, M., FOX, P. F., SMACCHI, E., STEPANIAK, L., DAMIANI, P. Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. **Journal of Food Biochemistry**, 20, 227-246, 1996.

GOBBETTI, M., FOX, P. F., STEPANIAK, L. Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. **Journal of Dairy Science**, 80, 3099-3106, 1997.

GÖTZ, F., BANNERMAN, T., SCHLEIFER, K. H. The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K. H., STACKENBRANDT, E. **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. Volume 4. p. 5-75, 2006.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64, 763–781, 2004.

HA, S. H., LAN, M. N., LEE, S. H., HWANG, S. M., KOO, Y. M. Lipase catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, 41, 480–483, 2007.

HARGBERG, E. C., HAILSLIP, J. R., JOHNSON, B. R., 1988 **Method for producing a highly flavored cheese ingredient**. United States Campbell Soup Company. PATENTE 4752483, 21 de junho de 1988.

HAKI, G. D., RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. **Bioresource Technology**, 89, 17–34, 2003.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 235–251, 2006.

HOLPFAZEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKKROTH, J., SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal for Clinical Nutrition**, 73 (2), 365S-373S, 2001.

HORCHANI, H., MOSBAH, H., SALEM, N. B., GARGOURI, Y., SAYARI, A. Biochemical and molecular characterization of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 56(4), 237–245, 2009.

HOTELIER, T., RENAULT, L., COUSIN, X., NEGRE, V., MARCHOT, P., & CHATONNET, A. ESTHER, the database of the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold superfamily of proteins. **Nucleic Acid Research**, 32, 145–147, 2004.

IACUMIN, L., COCOLIN, L., CANTONI, C., COMI, G. Preliminary analysis of the lipase gene (gehM) expression of *Staphylococcus xylosus* in vitro and during fermentation of naturally fermented sausages (in situ). **Journal of Food Protection**, 70, 2665–2669, 2007.

IACUMIN, L., COMI, G., CANTONI, C., COCOLIN, L. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. **Meat Science**, 74(2), 281–288, 2006.

JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W. COLSON, C., VAN HEUVEL, M., MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, 15, 29-63, 1994.

JAEGER, K. E., REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 16, p.396-403, 1998.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, 53, 315–335, 1999.

JAEGER, K. E., EGGERT, T. Lipases for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 390-397, 2002.

JIANG, Z., ZHENG, Y., LUO, Y., WANG, G., WANG, W., MA, Y., et al. Cloning and expression of a novel lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Molecular Biotechnology**, 31, 95–101, 2005.

KANG, H. C., KIM, J. B., LEE, H. S., CHO, K. J. Cloning and characterization of an esterase from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Applied Biology and Chemistry**, 51, 95-101, 2008.

- KELLY, S. M., PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, 1(4), 349–384, 2000.
- KLEEREBEZEM, M., BOEKHORST, J., VAN KRANENBURG, R., MOLENAAR, D., KUIPERS, O. P., LEER, R. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100, 1990-1995, 2003.
- KENNEALLY, P. M., LEUSCHNER, R. G., ARENDT, E. K. Evaluation of the lipolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. **Journal of Applied Microbiology** 84, 839-846, 1998.
- KOZACINSKI, L., DROSINOS, E., CAKLOVICA, F., COCOLIN, F., GASPARIK-REICHARDT, J., VESKOVIC, S. Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. **Food Technology and Biotechnology**, 46, 93–108, 2008.
- LANSER, A. C., MANTHEY, L. K., HOU, C. T. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. **Current Microbiology** 44, 336-340, 2002.
- LATHA, K., RAMARETHIAM, S. Studies on lipid acyl hydrolases during tea processing. **Annual Plant Physiology** 3, 73-78, 1999.
- LARIOS, A., GARCÍA, H. S., OLIART, R. S., VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antartica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65, 373–376, 2004.
- LIU, S. Q., HOLLAND, R., CROW, V. Synthesis of ethyl butanoate by a commercial lipase in aqueous media under conditions relevant to cheese ripening. **Journal of Dairy Research**, 70, 359–363, 2003.
- LONG, Z. D., XU, J. H., ZHAO, L. L., PAN, J., YANG, S., HUA, L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioreolution of racemic ketoprofen. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 47, 105-110, 2007.
- LOPES, M. F. S., CUNHA, A. E., CLEMENTE, J. J., CARRONDO, M. J. T., CRESPO, M. T. B. Influence of environmental factors on lipase

production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, 249-254, 1999.

LOPES, M. F. S., LEITA, A. L., REGALLA, M., MARQUES, J. J. F., CARRONDO, M. J. T., CRESPO, M. T. B. Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, 76, 107-115, 2002.

LUI, B., QIAN, X., WU, Q., LIN, X. Two lipase-catalyzed sequential synthesis of drug derivatives in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, 43, 375-380, 2008.

LUMOR, S. E., AKOH, C. C. Esterification and hydrolytic activities of *Candida rugosa* lipase isoform 1 (LIP1) immobilized on celite 545, duolite A7, and sephadex G-25. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 56, 10396-10398, 2008.

LUBARY, M., HORST, J. H. T., HOFLAND, G. W., JANSSENS, P. J. Lipase-catalyzed Ethanolysis of Milk Fat with a Focus on Short-Chain Fatty Acid Selectivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 116-121, 2009.

MA, J., ZHANG, Z., WANG, B., KONG, X., WANG, Y., CAO, S., FENG, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, 45, 22-29, 2006.

MACEDO, G. A.; LOZANO, M. M. S., PASTORE, G. M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, 6, 72-75, 2003.

MAIA, M. D. D., HEASLEY, A., CAMARGO DE MORAIS, M. M., MELO, E. H. M., MORAIS, M. A., JR, LEDINGHAM, W. M., et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, 76, 23-27, 2001.

MONTEL, M. C., REITZ, J., TALON, R., BERDAGUE, J. L., ROUSSET, S. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of dry sausages model. **Food Microbiology** 13, 489-499, 1996.

MOOSAVI-NASAB, M., RADİ, M., JOUYBARI, H A. Investigation of enzyme modified cheese production by two species of *Aspergillus*. **African Journal of Biotechnology**, 9 (4), 508-511, 2010.

MOROT-BIZOT, S., TALON, R., LEROY-SETRIN, S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. **Journal of Microbiological Methods**, 55, 279–286, 2003.

MOSBAH, H., SAYARI, A., MEJDOUB, H., DHOUB, H., GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1723, 282–291, 2005.

MOSBAH, H., SAYARI, A., BEZZINE, S., GARGOURI, Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification** 47, 516-523, 2006.

MOSBAH, H., SAYARI, A., HORCHANI, H., GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification** 55, 31-39, 2007.

MULLER-SANTOS, M., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., MITCHELL, D. A., LONGHI, S., CARRIÈRE, F., CANAAN, S., KRIEGER, N. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from halophilic archae *Haloarcula marismortui*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1791, 719-729, 2009.

NARDINI, M., DIJKSTRA, B. W.  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**, 9, 732-737, 1999.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering**, 5, 197–211, 1992.



PALMA-FERNANDEZ, E. R., GOMES, E., & SILVA, R. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiologica**, 47, 685–690, 2002.

PELISSER, M. R., **Clonagem, expressão e purificação de lipase de *Staphylococcus xylosus* e detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal**. 2008. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

QUINTANA-CASTRO, R., DÍAZ, P., GERARDO VALERIO-ALFARO, G., HUGO, S., GARCÍA, H. S., ROSAMARÍA OLIART-ROS, R. Gene cloning, expression, and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkaliphilic lipase. **Molecular Biotechnology**, 42, 75–83, 2009.

RANTSIOU, K., IACUMIN, L., CANTONI, C., COMI, G., COCOLIN, L. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 97, 277–284, 2005.

RHEE, J. K., AHN, D. G., KIM, Y. G., OH, J. W. New Thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, 817–825, 2005.

ROMERO, M. D., CALVO, L., ALBA, C., DANESHFAR, A., GHAZIASKAR, H. S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, 37, 42–48, 2005.

ROSENSTEIN, R., GÖTZ, F. GenBank entry, accession n° AF208229, 1999.

ROSENSTEIN, R., & GÖTZ, F. *Staphylococcal* lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, 82, 1005–1014, 2000.

ROUSTAN, J. L., CHU, A. R., MOULIN, G., BIGEY, F. A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: Expression and

characterization of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 68, 203–212, 2005.

SAKINÇ, T., KLEINE, B., GATERMANN, S. G. Biochemical characterization of the surface-associated lipase of *Staphylococcus saprophyticus*. **FEMS Microbiology Letters**, 274, 335–341, 2007.

SALAH, R. B., GHAMGHUI, H., MILED, N., MEJDOUB, H., GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 103(4), 368–372, 2007.

SARDA, L., DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, 30, 513–521, 1958.

SAWITZKI, M. C., FIORENTINI, A. M., BROD, F. C. A., TAGLIARI, C., BERTOL, T. M., ARISI, A. C. M., SANT'ANNA, E. S. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 547–552, 2007.

SAYARI, A., AGREBI, N., JAOUA, S., GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. **Biochimie**, 83, 863–871, 2001.

SBARRA, V., BRUNEAU, N., MAS, E., HAMOSH, M., LOMBARDO, D., HAMOSH, P. Molecular cloning of the bile salt dependent lipase of ferret lactating mammary gland: an overview of functional residues. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism**, 1393 (1), 80–89, 1998.

SECUNDO, F., CARREA, G., TARABIONO, C., GATTI-LAFRANCONI, P., BROCCA, S., LOTTI, M., et al. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, 39, 166–170, 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, 627–662, 2001.

SHAY, L. K., FISCHER, T. J. **Enhancing the flavor of protein products derived from microorganisms**. United States Phillips Petroleum Company. PATENTE 5071762, 12 de outubro de 1991.

SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., MARCINÁKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VESTERLUND, S., LATORRE-MORATALLA, M., et al. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, 73, 559–564, 2006.

SIMONS, J. W. F. A., VAN KAMPEN, M. D., RIEL, S., GOTZ, F., EGMOND, M. R., VERHEIJ, H. M. Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*: comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. **European Journal of Biochemistry**, 253, 675–683, 1998.

SOLIMAN, N. A., KNOLL, M., ABDEL-FATTAH, Y. R., SCHMID, R. D., LANGE, S. Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. **Process Biochemistry**, 42, 1090–1100, 2007.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1543, 223–238, 2000.

TALON, R., MONTEL, M. C., & BERDAGUE, J. L. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 19, 620–622, 1996.

TALON, R., WALTER, D., CHARITER, S., BARRIÈRE, C., MONTEL, M. C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, 52, 47–56, 1999.

TIESINGA, J. J. W., VAN POUDEROYEN, G., NARDINI, M., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W. Structural basis of phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. **Journal of Molecular Biology**, 371, 447–456, 2007.

TYNDALL, J. D. A., SINCHAIKUL, S., FOTHERGILL-GILMORE, L. A., TAYLOR, P., WALKINSHAW, M. D. Crystal structure of a

thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. **Journal of Molecular Biology**, 323, 859–869, 2002.

VAN KAMPEN, M. D., ROSENSTEIN, R., GÖTZ, F., EGMOND, M. R. Cloning, purification and characterization of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1554, 229–241, 2001.

VAN OORT, M. G., DEVEER, A. M. T J., DIJKMAN, R., TJEENK, M. L., VERHEIJ, H. M., DE HAAS, G. H., WENZIG, E., GÖTZ, F. Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. **Biochemistry** 28, 9278-9285, 1989.

VERNAL, J., SERPA, V. I., TAVARES, C., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., TERENCE, H. Expression, purification and biochemical characterization of a single-stranded DNA binding protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, 53, 195-200, 2007.

VOGEL, R. F., GAINER, W., HAMMES, W. P. Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* in *Lactobacillus curvatus* Lc2-c. **FEMS Microbiology Letters** 69, 289-292, 1990.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. **Trends in Biotechnology**, 23 (6), 316-320, 2005.

WHITMORE, L., WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, 32, W668-W673, 2004.

WINKLER, U. K., STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, 138 (3), 663-670, 1978.

WOODY, R. W. Circular dichroism. **Methods in Enzymology**, 246, 34–71, 1995.

YAMAMOTO, K., FUJIWARE, N. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolysing lipase from *Pseudomonas* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, 52, 3015-3021, 1998.

YAO, H., YU, S., ZHANG, L., ZUO, K., LING, H., ZHANG, F., et al. Isolation of a novel lipase gene from *Serratia liquefaciens* S33 DB-1, functional expression in *Pichia pastoris* and its properties. **Molecular Biotechnology**, 38, 99–107, 2008.

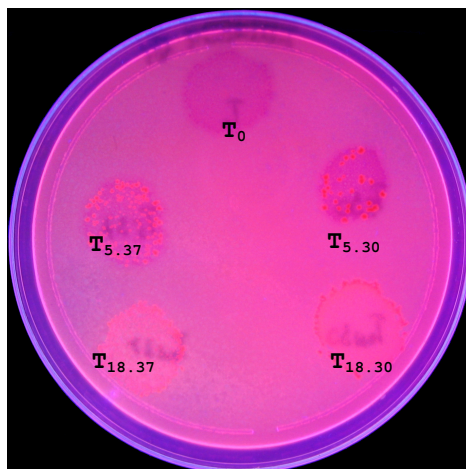
ZHANG, A., GAO, R., DIAO, N., XIE, G., GAO, G., CAO, S. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56, 78-84, 2008.



**ANEXO A – Hidrólise de triglicerídeos por *E. coli* expressando a lipase recombinante**







Hidrólise de triglicérides por *E. coli* expressando a lipase recombinante. T0: antes da indução com IPTG; T5.30: células incubadas a 30°C, 5 horas após indução com IPTG; T5.37: células incubadas a 37°C, 5 horas após indução com IPTG; T18.30: células incubadas a 30°C, 18 horas após indução com IPTG; T18.37: células incubadas a 37°C, 18 horas após indução com IPTG. Após a lise das células, 100 µL de cada sobrenadante foram adicionados em placas contendo rodamina B e óleo de oliva, incubadas por 15 h e fotografadas sob luz UV.



**ANEXO B – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da  
esterase de *L. plantarum* (GQ497844.1) com outras proteínas**



```

gi|227104662|gb|EEI39690.1| 1 -----MNADGERLAPEMAVVGWSAANIPGMGLGTTDVLGSRRDID---
gi|145225140|ref|YP_001135818. 1 -----MPGPTLDDAAARVAFSGPIPPMHERGLDAVRAG-----
gi|17943077|pdb|1JJI|A 1 -----MLDMPIDPVYQLAEYFDSLPKFD-QFSAREYREAINRIY
gi|183754703|pdb|2C7B|A 1 -----XPLDP---QIKPILERIRALS-IAASPQELRRQVE---E
gi|11513478|pdb|1EVQ|A 1 -----MPLDPVIQQVLDQLNRMPPADYKHLSAQQFR-----S
gi|224498465|ref|ZP_03666814.1 1 -----MSECEKYNKMDRYRFCWDHSTSIINRFLYLQKAVGKKEYNPEVLENLEASQEFVKNTSPLSDVDSRYKYMR-L
gi|260101021|gb|GQ497844.1| 1 ---MPTINSIQTTVNGVVKIVKPFNNDIAG-----EQFDPHVLQTLTAFKQPAILENDLAALRSGS-----
gi|28377793|ref|NP_784685.1| 1 ---MPTINSIQTTVNGVVKIVKPFNNDIAG-----EQFDPHVLQTLTAFKQPAILENDLAALRSGS-----
gi|116334726|ref|YP_796253.1| 1 MLNDTTTKQSLGYSDELHRLQIEIGVTDIADGVTSWVKEREPAHTFEPVLVWETVAGIEANQLPTDLFSLRQGT-----
gi|187732022|ref|YP_001879185. 1 -----MKPENKLPVLDLISAEMKTVVNTLQPDLPSPWATGTIAEQQRYY

gi|227104662|gb|EEI39690.1| 41 ISATTMAENLPFAVEEDLTFDGGPLAATRYRAT-ESSSG-LIIFYHGGGFVLGSRISHGVARRLALGAGVDVLAVD
gi|145225140|ref|YP_001135818. 35 VENTPVPDDMPAMASIEERCAPGPDGPILRIYRET-DATDASVVVYFHGGGMVMSGNSRSEFLARALAAGSTATVVSVD
gi|17943077|pdb|1JJI|A 41 EERNRQLSQHERVERVEDRTIKGRNGDIRVRVYQOK-PDS--PVLVYYHGGGFVICIESHDLACRRIRLNSNSTVVSVD
gi|183754703|pdb|2C7B|A 33 QSRLLTAAVQPEIAETRDVHLPVSGGSIRARVYFPK-KAAGLPAVLVYHGGGFVFGSIETHDHICRRLSRLSDSVVSVD
gi|11513478|pdb|1EVQ|A 33 QQSLFPVPVKKEPVAEVRFDXDLPGRTLKVXRYRPEGVEPPYPALVYYHGGGMVWVNDLQETHDPVCRVLAKDGRVAVFSVD
gi|224498465|ref|ZP_03666814.1 74 ATKALPSAKDIEIGDVENKKIDGPAKPIRIRIYTPQ-EDGPFEIIVYYHGGGFVLGGLQTHDAIARKLVQTTGARVVTVD
gi|260101021|gb|GQ497844.1| 58 -LTPAIADPVGDAVTVQSRNITALNRTVSVEWLTPONVIN-HTVLVYFHGGAFYGGVPGNNTVLLKLVAAKSHCEILNVD
gi|28377793|ref|NP_784685.1| 58 -LTPAIADPVGDAVTVQSRNITALNRTVSVEWLTPONVIN-HTVLVYFHGGAFYGGVPGNNTVLLKLVAAKSHCEILNVD
gi|116334726|ref|YP_796253.1| 73 -ETSGQRDLTTTAMKIEMQQIVAMNRRVRVIRIAREDLNADKAYIFYHGGAYYGGTPEDVLALKFVAEQANCVVYNVD
gi|187732022|ref|YP_001879185. 45 TLERRFWNAGAPEMATRAYMVPKYQVETRLFCFQ--PDSPATLFYHGGGFILGNLTDHDIRMLLASYSQCTVIGID

gi|227104662|gb|EEI39690.1| 119 YRLAPENFPFAAVD DALATWRFVAVRSAPQWGLAPERIVVAGDSAGGNLAAVLAQQVR--GEQ-VVPCRVLLYPMTDASS
gi|145225140|ref|YP_001135818. 114 YRLAPEHPAPACQFVDCSAVTTWVAENATSLGVDPARLAVAGDSAGGSLAAAVTLAAR--DCGGPVICAQVLMYPGLDRDM
gi|17943077|pdb|1JJI|A 118 YRLAPEHKFPAAVYDCYDATKWVAENAEELRIDPSKIFVGGDSAGGNLAAAVSIMAR--DSGEDFIKQIILYIPVNV-FV
gi|183754703|pdb|2C7B|A 112 YRLAPEYKFPTAVEDAYALKWVADRDELGVDPDRIAVAGDSAGGNLAAAVVSILDR--NSGEKLVKKQVLLIYPVNXTG
gi|11513478|pdb|1EVQ|A 113 YRLAPEHKFPAAVEDAYDALQWIAERAADFHLDPARIAVGGDSAGGNLAAAVTSILAK--ERGGPALAFQLLIYPSTGYDP
gi|224498465|ref|ZP_03666814.1 153 YRLAPENFPFAAVEDAYALWVQNHRSTSLAKSSDIIVAGDSVGGNLA TVVTQIAK--SKGKPNITAQIILYPATDIFS
gi|260101021|gb|GQ497844.1| 137 YSLAPEAPAPAGILDGLAIFYQYLEQRDAET-----MITVAGDSAGANVIMAAATNLNQ--QLGSNRINQQLLIYPVTAPNA
gi|28377793|ref|NP_784685.1| 137 YSLAPEAPAPAGILDGLAIFYQYLEQRDAET-----MITVAGDSAGANVIMAAATNLNQ--QLGSNRINQQLLIYPVTAPNA
gi|116334726|ref|YP_796253.1| 153 YALAPEQFPAGILDGLAVVAAMTAEYAH-----ISLGGDSAGASTALGVSQCLK--SMGICETASHVLFYPTVQVGS
gi|187732022|ref|YP_001879185. 123 YPLSPEARFPQAIIEIIVAACCYFHQQAEQDYQINMSRIGFAGDSAGAMLALASALWLRDKQIDCGKIAGVLLWYGLGLRD

```

```

gi|227104662|gb|EEI39690.1| 196 RHP-----SRDEFAQG-----LFLTEERIRFFTDNYTPDESVRTDERSVPLLADDLSGLPPAHVLVAGFDPLRDE
gi|145225140|ref|YP_001135818. 192 AAP-----SMVAMPDA-----PILLSRADIDYMHELADDGVGAPHDAYRIPAYAE DL SGLPPAIVVTGECDFIRDW
gi|17943077|pdb|1JJI|A 195 APT-----PSLLEFG---EGLWILDQKIMSWFSEQYFSREED-KFNEPLAS-VIFADLENLPPALITAEYDPLRDE
gi|83754703|pdb|2C7B|A 190 VPT-----ASLVEFGV---AETTSLEPIELXVWFGROYLKRPEE-AYDFKAS-PLLADLGGLPPALVVTA EYDPLRDE
gi|11513478|pdb|1EVQ|A 191 AHP-----PASIEEN---AEGYLLTGXXLWFRDQYILNSLEE-LTHFWFSPVLYPDL SGLPPAYITATQYDPLRDV
gi|224498465|ref|ZP_03666814.1 231 RDA-----SVLYPSMDEFAEGYVLTKE SLDKFKLYIANASDRKYDPLVAPIRSKDLVGLPKFTATAEFDPLRDQ
gi|260101021|gb|GQ497844.1| 210 DHAGPLWDLA AFPIID SQRAILTN YHDLFRQLDSIMTDYYVPEN-FDSHSP LISPLHQENFTMTPTTTIMVGEFDFFRPQ
gi|28377793|ref|NP_784685.1| 210 DHAGPLWDLA AFPIID SQRAILTN YHDLFRQLDSIMTDYYVPEN-FDSHSP LISPLHQENFTMTPTTTIMVGEFDFFRPQ
gi|116334726|ref|YP_796253.1| 224 KLTGPLWDDNQITIVPEQRAALHRSYQLFEQLDAIMSGYYVADQAVDLTAPLLSPLLADPTTFHN-VTLLVG EYDFFRLQ
gi|187732022|ref|YP_001879185. 203 SVTR-----RLGGVWDG-----LTQQDLQMYEEAYLSNDAD-RESFYCYLFNNDLTREVPCF TAGAEFDPLLD

```

```

gi|227104662|gb|EEI39690.1| 261 GLAYAQRLADAGVAVTVQRESSMLHAFANMTVFSADARAALDRVCAAVRDGLAEAPRRPVSA GEQDSIAATS
gi|145225140|ref|YP_001135818. 257 GERYAQRLRDARVQTTLTRYPGMYHGFLMRPDGTARGRLAMAEIGALLRAKFAEPLPF-----
gi|17943077|pdb|1JJI|A 261 GEVFGQMLRRAGVEASIVRYRGVLHGFINYYPV LKAARDAINQIAALLVFD-----
gi|83754703|pdb|2C7B|A 257 GELYAYKKXAGSGRAVAVRFAGXVHGFSFYFPVDAGREALDLAAASIRSGLOPS-----
gi|11513478|pdb|1EVQ|A 258 GKLYAEALNKA GVKVEIENFEDLIHGFAQFYSLSPGATKALVRIAEKLRDALA-----
gi|224498465|ref|ZP_03666814.1 302 GEAYAKKLKDA GVEVF AKRFEKVPHGFMFTN--SEATDETYELISEFLEEK-----
gi|260101021|gb|GQ497844.1| 289 AWAYAQRLAAADTATTTIQYQGLNHAFAPLVDQYWQSQDVAQVMAAALI-----
gi|28377793|ref|NP_784685.1| 289 AWAYAQRLAAADTATTTIQYQGLNHAFAPLVDQYWQSQDVAQVMAAALI-----
gi|116334726|ref|YP_796253.1| 303 GEAFVKRVGHANGDTNYFRYGGISHAF LNFTGNVPAVEDALMTAAKFI-----
gi|187732022|ref|YP_001879185. 268 SRLLYOTLA AHQQPCEFKLYPGTLHVF LHYSRMMKTADEALRDGAQFFTAQL-----

```

Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da esterase de *L. plantarum* (GQ497844.1) com outras proteínas. Os aminoácidos putativos da tríade catalítica estão representados em caixas pretas. GQ497844.1 esterase de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; NP\_784685.1 lipase/esterase de *Lactobacillus plantarum* WCFS1; EEI39690.1 esterase/lipase de *Gordonia bronchialis* DSM 43247; YP\_796253.1 esterase/lipase de *Lactobacillus brevis* ATCC 367; ZP\_03666814.1 lipase de *Listeria monocytogenes* Finland 1988; YP\_001135818.1 proteína contendo domínio de alpha/beta hidrolase de *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK; YP\_001879185.1 acetilesterase de *Shigella boydii* CDC 3083-94; pdb1JJI carboxilesterase de *Archaeoglobus fulgidus*; pdb2C7B de Uncultured archaeon estE1 carboxilesterase; pdb1EQV carboxylesterase de *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

